

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Lucie Hrubá

SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ CHONDROITIN
SULFÁTU TECHNIKOU SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZY

Spectrophotometric Determination of Chondroitin Sulphate by
Sequential Injection Analysis

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

Abstrakt:

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací stanovení chondroitin sulfátu sekvenční injekční analýzou za spektrofotometrické detekce. Reakce probíhá za přítomnosti fenothiazinových kationtových barviv (azur A, azur B a methylenová modř) a měří se pokles absorbance barviv v jejich absorpčním maximu po přidání chondroitin sulfátu (CS). Byly nalezeny optimální podmínky pro toto stanovení: koncentrace barviv $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, dávkovaný objem $100 \mu\text{l CS} + 50 \mu\text{l barviva} + 100 \mu\text{l CS}$, reakční čas 0 s a průtoková rychlost $40 \mu\text{l s}^{-1}$. Pro stanovení CS ve statickém uspořádání bylo zjištěno, že nejnížší meze detekce a stanovitelnosti bylo dosaženo při použití methylenové modře ($\text{LOD} = 0,23 \text{ mg l}^{-1}$ a $\text{LOQ} = 0,76 \text{ mg l}^{-1}$). Pro toto barvivo bylo dosaženo i nejlepší opakovatelnosti a to 2,4 %. Ovšem nejcitlivější bylo stanovení s použitím azuru A. Pro stanovení CS v SIA uspořádání bylo dosaženo nejnížší meze detekce a stanovitelnosti u azuru A ($\text{LOD} = 0,34 \text{ mg l}^{-1}$ a $\text{LOQ} = 1,01 \text{ mg l}^{-1}$), opakovatelnost byla taktéž nejlepší 1,9 %. Jako nejcitlivější metoda se projevilo stanovení s použitím azuru B

Na základě těchto poznatků byl chondroitin sulfátu stanoven v potravinových doplňcích, kde se ukázala jako vhodnější metoda kalibrační přímky. Stanovení bylo provedeno i v přítomnosti interferujících látek a to chloridu sodného a heparinu, kde se jako významný interferent projevil heparin a naopak chlorid sodný se vůbec jako interferent nechoval.

Klíčová slova

Metody průtokové analýzy

Sekvenční injekční analýza

Optimalizace

Farmaceutické přípravky

Abstract:

This thesis deals with the optimization determination of chondroitin sulfate sequential injection analysis with spectrophotometric detection. The reaction proceeds in the presence of phenothiazine cationic dyes (Azure A, Azure B and methylene blue) and measuring the decrease absorbance dyes in their absorption maximum after the addition of chondroitin sulfate. Have found the optimum conditions for this determination: dye concentration $5 \cdot 10^{-5} \text{ mole dm}^{-3}$, the dosing volume 100 μl CS + 50 μl dye + 100 μl CS, reaction time 0 s, flow rate 40 $\mu\text{l s}^{-1}$. For the determination of the CS in a static arrangement was found the lowest limit of detection and quantification using methylene blue ($\text{LOD} = 0,23 \text{ mg l}^{-1}$ a $\text{LOQ} = 0,76 \text{ mg l}^{-1}$). The best repeatability was achieved also using methylene blue 2,4 %. On the other side the best sensitivity was achieved using azure A. For the determination of the CS in SIA arrangement was found the lowest limit of detection and quantification using azure ($\text{LOD} = 0,34 \text{ mg l}^{-1}$ a $\text{LOQ} = 1,01 \text{ mg l}^{-1}$). The best repeatability was achieved also using azure A 1,9 %. And the best sensitivity was achieved using azure B.

Based on these findings was chondroitin sulphate determined in food supplements, the more suitable method were the calibration curve. The determination was also carried out in the presence of interfering substances as sodium chloride and heparin. Heparin was showed as significant interferent.

Key words:

Methods flow analysis

Sequential injection analysis

Optimization

Pharmaceutical preparations

Poděkování:

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucímu své diplomové práce panu RNDr. Jakubovi Hraníčkovi, Ph.D. za přínosné rady a konzultace. Svým přátelům, především pak slečně Mgr. Renatě Tiché, a rodině za trpělivost a podporu po celou dobu mého studia

Obsah

1	Úvod.....	9
1.1	Cíl práce.....	9
2	Teoretická část.....	10
2.1	Průtokové metody	10
2.1.1	Segmentová průtoková analýza SFA	10
2.1.2	Průtoková injekční analýza FIA.....	11
2.1.3	SIA sekvenční injekční analýza	12
2.1.4	Mikrosekvenční injekční analýza v uspořádání lab on valve	15
2.2	Glykosaminoglykany	17
2.2.1	Chondroitin sulfát	17
2.2.2	Stanovení chondroitin sulfátu	18
2.3	Fenothiazin.....	19
2.3.1	Azur B	20
2.3.2	Azur A.....	20
2.3.3	Methylenová modř	21
3	Experimentální část	23
3.1	Použité chemikálie	23
3.1.1	Příprava roztoků	23
3.2	Použité přístroje	24
3.3	Uspořádání, detekce a ovládání	24
3.4	Statistické zpracování výsledků	27
4	Výsledky měření a diskuze	29
4.1	Statické uspořádání	29
4.1.1	Optimalizace koncentrací.....	29
4.1.2	Další reakční činidla.....	34
4.1.3	Vliv pH.....	34
4.1.4	Analýza reálných vzorků	35

4.2	Průtokové uspořádání	39
4.2.1	Optimalizace koncentrací.....	39
4.2.2	Dávkovaný objem	41
4.2.3	Reakční čas	42
4.2.4	Průtoková rychlost	43
4.2.5	Kalibrační závislost.....	44
4.2.6	Reálné vzorky	46
4.2.7	Interferenční látky	47
5	Závěr.....	50
6	Literatura	52

Seznam zkratek a symbolů

c_b	koncentrace barviva [mol dm^{-3}]
c_{cs}	koncentrace chondroitin sulfátu [mg l^{-1}]
c_i	koncentrace interferenčních látek [mg l^{-1}]
t_R	reakční čas [s]
DO	dávkový objem [μl]
λ	vlnová délka [nm]
SFA	segmentační průtoková analýza
FIA	průtoková injekční analýza
SIA	sekvenční injekční analýza
CS	chondroitin sulfát
MSFIA	vícepístová injekční analýza
SI-LOV	mikrosekvenční injekční analýza v uspořádání lab-on-valve
SI-BI-LOV	SI-LOV s použitím kuličkové injekce
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
LDR	lineární dynamický rozsah
M	molární hmotnost [g mol^{-1}]
δA	změna absorbance
MM	methylenová modř

1 Úvod

Chondroitin sulfát je glykosaminoglykan vyskytující se hlavně v mezibuněčných prostorech pojivových tkání. Je často užíván jako potravinový doplněk při bolestech kloubů. Je také indikován jako léčivo při osteoartróze. Průmyslově se získává extrakcí ze zvířecích chrupavek.

V této diplomové práci je chondroitin sulfát stanovován pomocí techniky sekvenční injekční analýzy s využitím spektrofotometrické detekce. Toto stanovení je založeno na interakci chondroitin sulfátu s fenothiazinovými barvivy, se kterými tvoří iontový asociát. Vznikem asociátu dochází ke změně absorpčního spektra fenothiazinového barviva a pokles absorbance při zvolené vlnové délce je využíván jako analytický signál úměrný koncentraci chondroitinu. Fenothiazinová barviva používaná v této práci jsou azur B, azur A a methylenová modř a jsou všechna kationtová. Sekvenční injekční analýza byla vyvinuta k odstranění nedostatků průtokové injekční analýzy. Tyto nedostatky byly odstraněny zmenšením dávkovaných objemů a zavedením plné automatizace procesu analýzy.

1.1 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo nalézt optimální podmínky pro stanovení chondroitin sulfátu technikou sekvenční injekční analýzy se spektrofotometrickou detekcí. Optimalizace se skládala z několika kroků. Nalezení vhodné koncentrace barviva, vhodných dávkovaných objemů, optimální reakční doby a průtokové rychlosti. Pro porovnání nalezených charakteristik metody stanovení chondroitin sulfátu bylo provedeno i stanovení ve statickém uspořádání.

Dalším cílem práce bylo tyto poznatky aplikovat na stanovení chondroitin sulfátu v reálných vzorcích farmaceutických přípravků a vzorku s biologickou maticí.

2 Teoretická část

2.1 Průtokové metody

Průtokové metody patří do oblasti analytických instrumentálních technik. Jejich společný a hlavní znak je dávkování vzorku a reagentu do toku nosné kapaliny. V tomto proudu nosné kapaliny se tvoří produkt, který je unášen do detekční cely, ze které je signál přenesen až do detektoru. Proud nosné kapaliny je zajišťován peristaltickými nebo pístovými pumpami. Signály těchto metod dostáváme v podobě píků.

Tyto metody mají mnoho výhod, které zajistily jejich běžné používání v analytických laboratořích. Doba jedné analýzy je velmi krátká a dá se tak stanovovat velké množství vzorků. Průtokové systémy v podobě tenkých hadiček jsou velmi krátké a také úzké a je tak nízká spotřeba činidel a vzorků, tím jsou metody i šetrné k životnímu prostředí, protože množství vzniklého odpadu je velmi malé. Minimalizuje se i kontakt pracovníků laboratoří se vzorky, tím se snižuje rizikovost při práci s toxickými a nebezpečnými látkami.

Mezi první průtokové metody patří segmentová průtoková analýza (SFA), průtoková injekční analýza (FIA) a sekvenční injekční analýza (SIA). První dvě metody byly ovládány ručně a až v době, kdy nastal pokrok v oblasti mikroelektroniky a počítačové techniky se zavedla automatizace řízená právě počítačovou technikou a první takovou byla SIA. Další metoda je vícepístová (multisyringe) injekční průtoková analýza (MSFIA) a miniaturizovaná SIA jako Lab On Valve (SI-LOV-labotaroř na ventilu).

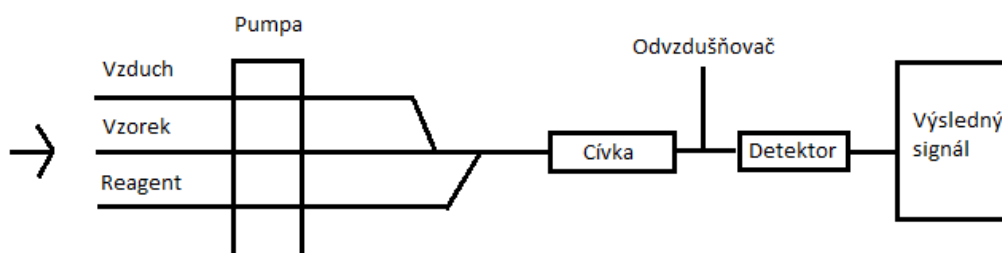
Tyto techniky se používaly hlavně v klinických a oceánografických laboratořích, zřejmě proto, že bylo potřeba analyzovat velké množství vzorků v krátkém čase a automatizace těchto technik výrazně usnadňuje práci [1].

2.1.1 Segmentová průtoková analýza SFA

Segmentová průtoková analýza byla jedna z prvních průtokových technik komercializovaná Techniconem. Tato metoda je založena na postupném nasávání vzorku a mezi něj jsou nasávány vzduchové bubliny následované mycím roztokem. Vše je unášeno do reakční cívky, kde se čeká na ustálený stav. Bubliny jsou obvykle

eliminovány před vstupem do detekční cely, která následuje hned po reakční cívce. Získaný signál je v podobě píku. Tato metoda je navržena tak, aby analyzovala jen jeden parametr v každém vzorku. Je však možno jeden vzorek rozdělit do několika kanálků, kde každý kanálek má svůj detektor a stanovuje se zde jeden parametr. I když toto provedení nabízí dobrou pracovní kapacitu, je značně nákladné a není schopné stanovit více než 20 parametrů. Vzhledem k přítomnosti vzduchových bublin nastává několik nežádoucích jevů, které způsobují rozmývání zón. Stlačitelnost vzduchu dovoluje pohyb roztoku uvnitř kapiláry i po zastavení toku. Systém je technicky složitý a tím je znemožněna jeho miniaturizace [2,3]. Schéma SFA je znázorněno na obr. 2.1.

SFA se hojně používá k analýze glukosy, fruktosy a sacharosy v tabákových listech [4]. Touto metodou se také například stanovují živiny (amonné ionty, dusitany, dusičnany nebo fosfáty) v mořské vodě [5].



Obr. 2.1: Schéma segmentové průtokové analýzy

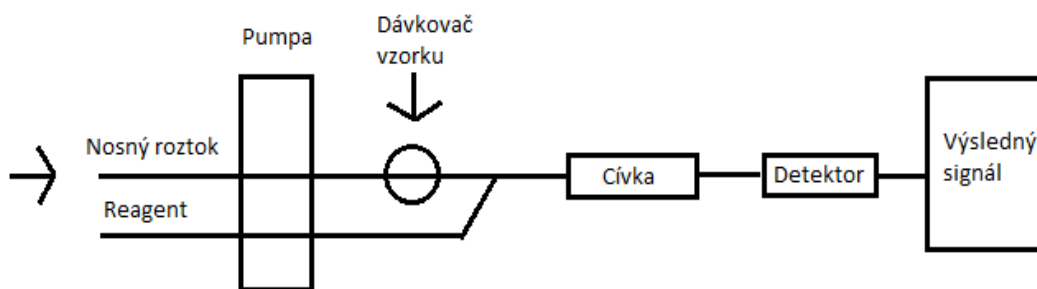
2.1.2 Průtoková injekční analýza FIA

Kvůli nedostatkům metody SFA byla vyvinuta metoda průtokové injekční analýzy (FIA). Tato technika byla navržena a v roce 1975 publikována J. Růžičkou a E. H. Hansenem [6]. Nalezla široké uplatnění v analytické chemii díky její jednoduchosti, nenáročné instrumentaci, přímočarosti a rychlosti analýzy. Reprodukovatelné časování a snadno regulovaná disperze má za následek, že detekce v ustáleném stavu již není nutná. Oproti SFA má FIA značné výhody ve zmenšení objemu dávkovaných vzorků, rychlosti analýzy a možnosti stanovovat více parametrů. Nevýhoda spočívá

v plastových kapilárách pro peristaltickou pumpu, protože vylučuje používání koncentrovanějších kyselin, hydroxidů nebo organických rozpouštědel [2].

FIA je založena na tom, že se vzorek dávkuje přímo do konstantního toku nosného činidla, tedy reagentu. Reakční zóny jsou unášeny nosným roztokem k detektoru. Během toho dochází k reakci reagentu s analytem a kontrolované disperzi. V případě této metody již nemusíme čekat na ustálený stav a metoda je tedy výrazně rychlejší než SFA. Jako analytický signál dostaneme pík [7]. Na obr. 2.2 je zobrazeno schéma této metody.

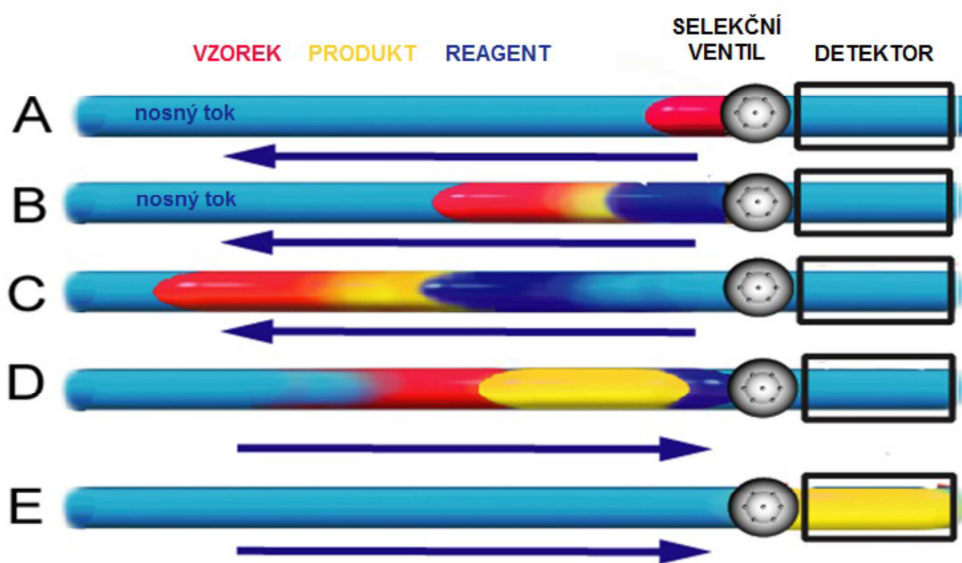
Touto metodou se stanovuje například chondroitin sulfát reakcí s azurem B za spektrofotometrické detekce [8]. Lze tak stanovit železo a měď v nanogramovém množství [9] nebo formaldehyd také za spektrofotometrické detekce [10]. Při použití enzymatické reakce s penicilinasou se stanovuje penicilin [11]. Tato technika je také aplikována při studii vazby DNA na platinové komplexy [12].



Obr. 2.2: Schéma aparatury průtokové injekční analýzy

2.1.3 SIA sekvenční injekční analýza

Tato metoda byla vyvinuta při odstraňování nedostatků metody FIA opět J. Růžičkou a E. H. Hansenem. Hlavní rozdíl mezi FIA a SIA je, že FIA používá přímý konstantní tok a SIA změnu přímého toku na zpětný. Princip této metody spočívá v postupném nadávkování nosného roztoku, vzorku a činidla pomocí vícecestného ventilu a pístového čerpadla jedním směrem. Poté je směr toku obrácen, tím se roztok více promíchá, a dochází ke vzniku produktu a ten je pak dopraven do detekční cely a signál do detektoru. Obr. 2.3 vysvětluje princip přímého a zpětného toku. Získaný signál je stejně jako u SFA a FIA v podobě píku.



Obr. 2.3: Princip změny směru toku u metody SIA [13]

Přes selekční ventil je do reakční cívky nadávkován postupně vzorek a poté přepnutím selekčního ventilu i reagent, což je zobrazeno ve variantě A. Varianta B a C znázorňuje tvorbu produktu při stále stejném směru toku. Ve variantě D je změněn směr toku přes selekční ventil a je tak podpořena tvorba produktu, produkt je poté poslán do detektoru a vyhodnocen signál [13].

Aparatura SIA se běžně skládá z dvoucestného ventilu, pístového čerpadla, díky němuž jsou všechny reakční složky včetně nosného roztoku nasávány do systému a vypuzovány ven. Další část je vícecestný selekční ventil, detektor, reakční cívka a systém spojovacích kapilár. Pohyb čerpadla a selekčního ventilu musí být naprosto synchronizován, nutná je opakovatelnost těchto kroků, protože tím se zajišťuje reprodukovatelnost systému. Velmi důležitou součástí systému je i dobrá vybavenost ovládacího softwaru a PC techniky. Jako nosný roztok se používá v naprosté většině voda, takže nedochází k poškozování kapilár.

Detektor se vybírá podle druhu analytické reakce, používají se hlavně spektrofotometrické, fluorescenční a elektrochemické.

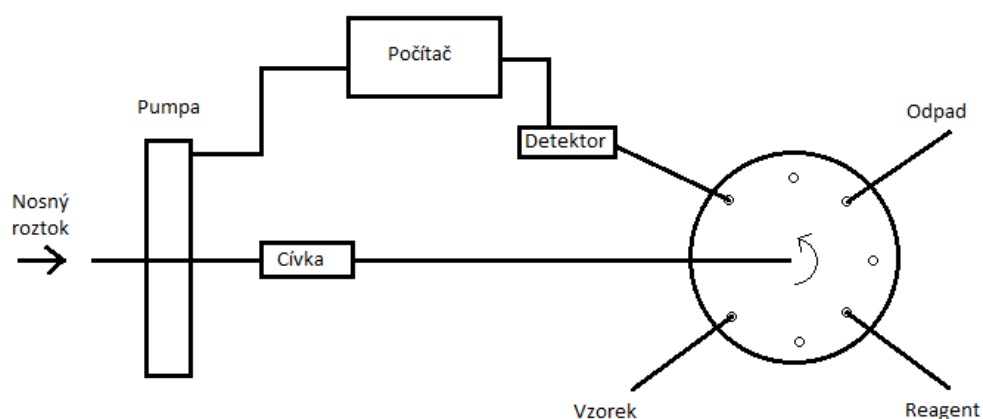
Výhody a nevýhody SIA techniky jsou shrnuty v tabulce 2.1.

Tabulka 2.1: Výhody a nevýhody metody SIA

Výhody SIA	Nevýhody SIA
Jednokanálové uspořádání, jeden ventil jedno čerpadlo	Nižší frekvence dávkování
Menší dávkované objemy	Náročnost na PC techniku
Flexibilita (díky PC technice)	
Programovatelné cykly, synchronizace, Opakovatelnost	

Průtokové rychlosti v SIA i FIA uspořádání jsou téměř stejné, pohybují se okolo $1,0 - 1,5 \text{ ml min}^{-1}$. Doba dávkování se v některých případech také může shodovat, u SIA většinou nepřekračuje 30 s jednoho dávkovaného cyklu. Díky počítačem řízenému ovládání SIA systému můžeme nastavovat a měnit sledované parametry po každém jednotlivém měření. V případě FIA stanovení je jeden parametr konstantní při celé sérii měření. SIA uspořádání je nakresleno na obr. 2.4.

SIA je v praxi uplatňována k analýze složek životního prostředí a je zde i značné využití v bioanalytickém, potravinářském a farmaceutickém odvětví [7]. Touto metodou se také stanovuje carbendazim v cereáliích, zelenině nebo ovoci [14]. Lze také stanovit ^{99}Tc [15] a ^{90}Sr [16] ve starém nukleárním odpadu. Metodu SIA lze uplatnit při stanovení anorganických iontů ve vzorcích vody, obsahu herbicidů nebo stopová množství některých těžkých kovů [7].

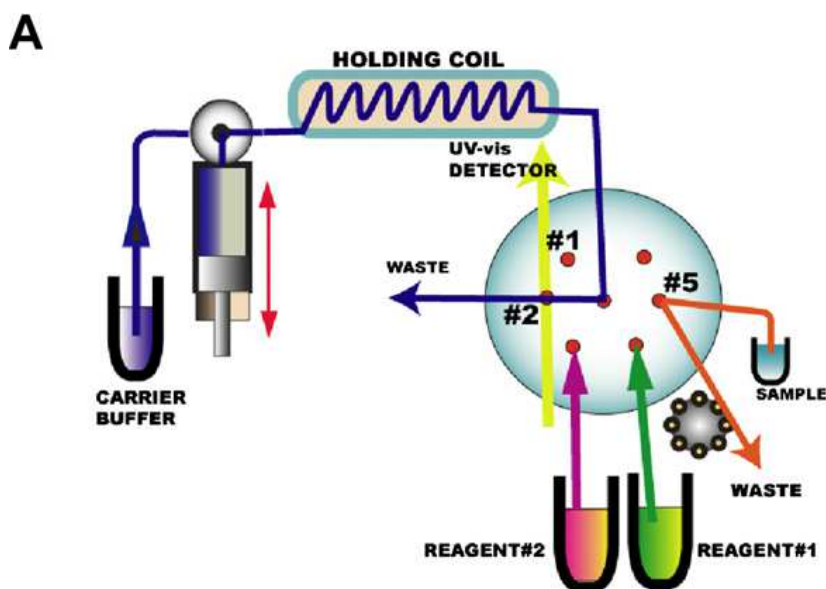


Obr. 2.4: Schéma aparatury sekvenční injekční analýzy

2.1.4 Mikrosekvenční injekční analýza v uspořádání lab on valve

Výhody sekvenční injekční analýzy založené na programovatelném toku byly zvýšeny miniaturizací realizovanou lab-on-valve (laboratoř na ventilu) uspořádáním (μ SI-LOV) [17]. Tato technika je považována za třetí generaci průtokových technik a umožňuje nové a specifické aplikace [18,19].

Jádro systému je založeno na počítačové technice, která ovládá systém stejně jako v případě SIA, vícecestném ventilu, centrálním portu, který je připojen přes mísící cívku, a přesné pumpě, která čerpá vzorek a reagent do mísící cívky. Tam se vytváří produkt a vše je transportováno do detektoru [17]. Na obr. 2.5 je znázorněn selekční ventil a schéma, jak je průtokový systém hadiček inkorporován do ventilu, systém uspořádání závisí na technice detekce. Integrovaná je víceúčelová průtoková cela, kde probíhá měření signálu optickými vlákny. Tento systém je velmi všestranný a může se používat i na optická nebo elektroanalytická měření [20,21]. Tím, že je detekční cela umístěna na selekčním ventilu, jsou zkráceny cesty reagentů a vzorků a tím je sníženo i jejich potřebné množství k analýze [22]. Tento fakt zajišťuje uplatnění μ SI-LOV při biochemických stanovení, též i s použitím kuličkové injekce (BI-bead injection) [23].



Obr. 2.5: Schéma μ SI-LOV [21]

Tímto spojením vzniká technika μ SI-BI-LOV, která je vyrobena z tvrdých PVC kanálků a je umístěna na šesticestném selekčním ventilu. Dva z nich včetně centrálního

jsou použity jako mikrokolony. Kuličky jsou zachyceny uvnitř kanálků sloužících jako mikrokolony. Na povrch těchto kuliček se váží reagenty a promýváním roztoku s analytem přes kuličky se v detekční cele optickým vláknem měří změna, která nastane při vzniku produktu. Pro každou analýzu jsou použity nové kuličky [18]. Používá se několik komerčně dostupných reagentů v podobě kuliček, Sephadex, Sepharose, agarosa a amoniak [21]. Srovnání všech výše uvedených technik je shrnuto v tabulce 2.2.

Tabulka 2.2: Srovnání výše uvedených metod [24]

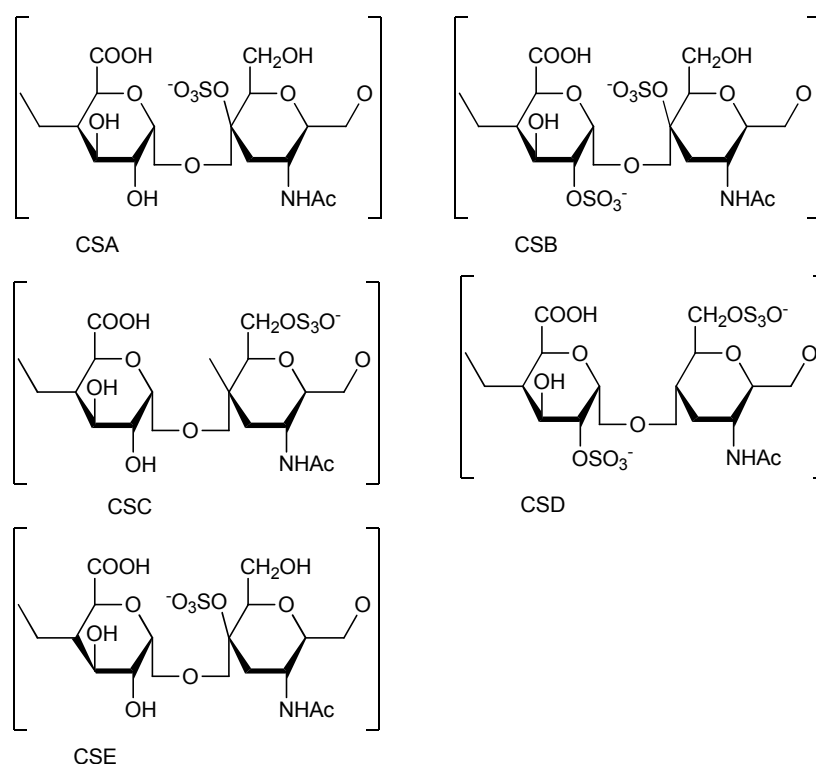
parametr	SFA	FIA	SIA	μSO-LOV
Objem vzorku	200 – 2000 μl	50 – 500 μl	50 – 200 μl	10 – 30 μl
Dávkování	kontinuální	ruční/auto	automatická	automatická
vzorku	čerpání	vstříknutí	injekce	injekce
Průměr vedení	1,0 – 2,0 mm	0,8 mm	0,5 – 0,8 mm	0,5 – 0,8 mm
Průtoková rychlost	< 1,0 ml min ⁻¹	0,5 – 1,0 ml min ⁻¹ kanál ⁻¹	řádově ml min ⁻¹	1,0 ml min ⁻¹
Segmentace vzduchem	ANO	NE	NE	NE
Počet analýz za hodinu	< 80	< 120	< 60	< 60
Spotřeba činidel	vysoká	nízká	až 10x menší než u FIA	minimální
Geometrie toku	pouze přímý	pouze přímý	programovatelná detekce změn	programovatelná detekce změn
Čerpání činidel	kontinuální	kontinuální	přerušované	přerušované
Detekce	v rovnovážném stavu	v rovnovážném stavu	v konstantním čase	v konstantním čase
Uspořádání	jedno i vícekanálové	jedno i vícekanálové	jednokanálové	jednokanálové

2.2 Glykosaminoglykany

Jsou to polysacharidy, které jsou tvořeny uronovými kyselinami a hexosaminovými zbytky. S vodou vytváří viskózní roztoky. Mohou se vázat na bílkoviny a tvořit tak proteoglykany. Do této skupiny polysacharidů patří chondroitin sulfát, kyselina hyaluronová, keratinsulfát nebo heparin [25].

2.2.1 Chondroitin sulfát

Chondroitin sulfát (CS) je lineární glykosaminoglykan (také mukopolysacharid), který se skládá ze sulfátovaných disacharidových jednotek, z D-glukuronové kyseliny a různě sulfátovaných zbytků N-acetyl-D-galaktosaminu. Nachází se hlavně v mezibuněčných prostorech pojivových tkání, kterými jsou chrupavky, pokožka nebo šlachy [25]. Těmito jednotkami spojenými vazbou $\beta(1\rightarrow3)$ je tvořen základní disacharid chondroitin sulfátu. Je známo více druhů. Chondroitin-4-sulfát (CSA), chondroitin-6-sulfát (CSC), chondroitin-2,6-sulfát (CSD), chondroitin-4,6-sulfát (CSE) a chondroitin-2,4-sulfát (CSB) [26], viz obr. 2.6.



Obr. 2.6: Vzorce různých druhů chondroitin sulfátu [27]

Chondroitin sulfát nemá jen pojivovou funkci, například se podílí na signalizační funkci růstových faktorů. Dále má zásadní vliv na vývoj centrální nervové soustavy, hojení ran a dělení buňky. Protože má chondroitin sulfát negativní náboj, váže na sebe ionty s kladným nábojem. Pomocí vodíkových vazeb se voda naváže na chondroitin sulfát a zadržuje se tak v mezibuněčných prostorech. Tento proces vede k větší pružnosti chrupavky. Proto se chondroitin sulfát používá jako doplněk stravy při problémech s klouby [27]. Byl také prokázán pozitivní vliv chondroitin-4-sulfátu a chondroitin-6-sulfátu na osteoartrózu [28,29]. Tento fakt podporují další výhodné vlastnosti chondroitin sulfátu. Má protizánětlivý, anti-apoptický a antioxidační charakter. Působí na hlavní buněčné signalizační dráhy [29].

CS je získáván ze zvířecích chrupavek a poté je používán při již zmíněných obtížích [30].

Chondroitin sulfát se užívá mimo jiné i jako potravinový doplněk, pomáhá ulevit od bolesti při problémech s klouby a také při osteoartritidě. Jeho denní dávkování by mělo být kolem 1200 mg. Avšak ne všechny preparáty obsahují udávané množství chondroitin sulfátu. Také proto bylo vyvinuto mnoho metod, jak chondroitin sulfát stanovit nejen v potravinářských doplncích [31].

2.2.2 Stanovení chondroitin sulfátu

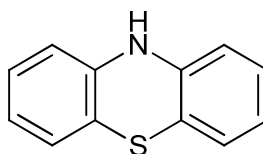
V současné době lze chondroitin sulfát stanovit mnoha metodami, ať už se jedná o spektrofotometrické, chromatografické nebo třeba elektrochemické stanovení[30]. Jednou z těchto metod je vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normální nebo reverzní fází, iontově párová a iontově výměnná chromatografie [32,33]. Lze provést i vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s UV detekcí, které však předchází enzymatická hydrolýza. K této hydrolýze se používá specifický enzym pro chondroitin sulfát chondroitinasa [34]. Jiná metoda je založena na kyselé hydrolýze CS na monosacharidy, následné derivatizaci s ortho-ftaldialdehydem a kapalinové chromatografii s reverzní fází a UV detekcí [35]. Analýzu celé skupiny glykosaminoglykanů je možno provádět také kapilární elektroforézou. Při této metodě je opět potřeba rozštěpit vysokomolekulární glykosaminoglykany specifickými enzymy na oligosacharidové fragmenty [36]. Kapilární elektroforéza se používá i při metodě, která je založena na selektivní digesti chondroitin sulfátu specifickou chondroitinasou

a následné separaci uvolněných nenasycených disacharidů [37]. Štěpení pomocí enzymů využívá i metoda MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrofotometry), která se používá ke zjištění koncentrace nenasycených disacharidů chondroitin sulfátu, které vznikly enzymatickým štěpením nativního chondroitin sulfátu enzymem lyasou [38]. Další metoda je například FIA, kde je podobně jako u SIA metody, která je prováděna v této práci, měřena změna absorbance fenothiazinových barviv v závislosti na koncentraci chondroitin sulfátu [8]. Další metody jsou například Ramanova spektroskopie a infračervená spektrometrie v blízké oblasti, která poskytuje rychlou, jednoduchou, reprodukovatelnou a nedestruktivní kvantitativní analýzu chondroitin sulfátu [30]. V literatuře je také popsána velmi jednoduchá spektrofotometrická metoda stanovení chondroitin sulfátu. Metoda je založena na kondenzaci chondroitin sulfátu s karbazolem, kde za přítomnosti silné kyseliny dává roztok růžové zabarvení a měří se absorbance při absorpčním maximu 530 nm [39]. Některé metody stanovení chondroitin sulfátu mohou být založeny i na reakci biomolekul s komplexy kovů [40].

2.3 Fenothiazinová barviva

2.3.1 Fenothiazin

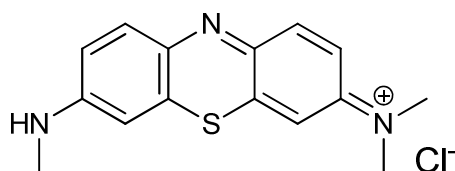
Fenothiaziny jsou skupina tricyklických heterocyklů bohatá na elektrony. Obsahují nitroskupinu a sulfátovou skupinu, které jsou inkorporovány v prostředním cyklu [41] strukturní vzorec na obr. 2.7. Fenothiazinové deriváty se dělí do dvou hlavních skupin. Jedna z nich zahrnuje látky používané hlavně v lékařství jako neuroleptika. Tyto látky jsou substituované v pozici 2 a 10 a léčí se jimi psychózy, schizofrenie nebo úzkosti. Takovou látkou je například chlorpromazin [42]. Druhou skupinou jsou barviva používaná hlavně jako indikátory. Tyto látky jsou substituované v poloze 3 a 7 a jsou to například azur B, azur A a methylenová modř.



Obr. 2.7: Strukturní vzorec fenothiazinu

2.3.2 Azur B

Azur B je chemická látka popsaná systematickým názvem 3-methylamino-7-dimethylaminofenothiazin chlorid ($C_{15}H_{16}ClN_3S$) a jeho molární hmotnost je $305,83 \text{ g mol}^{-1}$. Je to prášek zbarvený do tmavé modrozelené barvy. Absorpční maximum tohoto barviva je 645 nm [43]. Jeho strukturní vzorec je zobrazen na obr. 2.8.

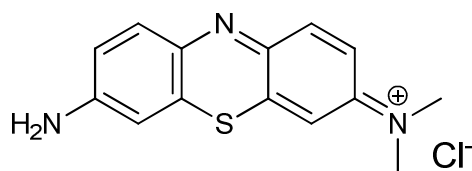


Obr. 2.8: Strukturní vzorec azuru B

Je to derivát fenothiazinu, který se v analytické chemii používá hlavně jako redoxní indikátor nebo se jím dají spektrofotometricky stanovovat anorganické a organické anionty [44]. Používá se také jako biologické barvivo k barvení částí rostlin [45]. V kombinaci s eozinem se používá k barvení krevních buněk, tomuto barvení se říká Romanowsky-Giemsa barvení [46]. Uplatňuje se také při stanovení dimethoatu, což je organofosfátový pesticid používaný proti škůdcům bavlny, kávy, čaje nebo tabáku [47]. Je také popsáno stanovení polyakrylamidu ve vzorcích vody pomocí rezonančního Rayleighova rozptylu záření [48] a stanovení penicilinu za spektrofotometrické detekce vzniklého iontového asociátu [49]. Azur B je jako reagent používaný při stanovení jodičnanů v kuchyňské soli [50], jodistanu ve vodě [51], arsenu [52] a selenu [53] a mědi v odpadních vodách nebo třeba v lidských vlasech [54]. Další literatura popisuje stanovení NADH průtokovou injekční analýzou za přítomnosti modifikovaného azuru B [44].

2.3.3 Azur A

Azur A systematickým názvem 3-amino-7-dimethylaminofenothiazin chlorid ($C_{14}H_{14}ClN_3S$) s molární hmotností $291,80 \text{ g mol}^{-1}$ je další z fenothiazinových derivátů. Je to stejně jako azur B prášek tmavě zelené barvy a absorpční maximum je při 633 nm . Jeho strukturní vzorec je na obr. 2.9.

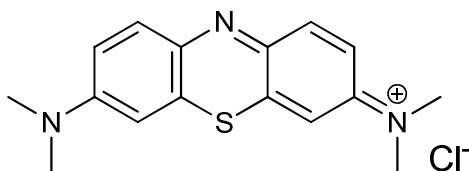


Obr. 2.9: Strukturní vzorec azuru A

Azur A se používá při stanovení protaminu. Stanovení spočívá v reakci protaminu s barevným komplexem heparinu a azuru A a následné změně zabarvení [55]. Také se používá k barvení buněk, mikroorganismů a tkání podobně jako azur B [56].

2.3.4 Methylenová modř

Systematický název methylenové modře je 3,7-bis(dimethylamino)fenothiazin chlorid ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$) a má molární hmotnost $373,19 \text{ g mol}^{-1}$. Také je to derivát v pevném skupenství, tvoří tmavě zelené krystalky nebo prášek. Je rozpustná ve vodě a v ethanolu. Je znázorněna na obr. 2.10.



Obr. 2.10: Strukturní vzorec methylenové modře

Používá se k barvení bakterií a jako indikátor [57]. Methylenová modř byla velmi využívaný lék v medicíně. Už v roce 1891 byla aplikována proti malárii. Identifikace *Mycobacterium tuberculosis* byla založena na biochemických vlastnostech methylenové modře, používala se také jako hygienický preparát. Zjistilo se, že má i antidepresivní a pozitivně psychotropní účinky. Podává se jako prevence a léčba v případě neurotoxicity způsobené ifosfamidem podávanými pacientům trpícím rakovinou. Současný zájem budí methylenová modř jako potencionální lék na Alzheimerovu chorobu [58].

Rychlá a snadná metoda je stanovení glykosaminoglykanů reakcí s methylenovou modří za spektrofotometrické detekce [59]. Stejně jako u azuru B je popsána metoda stanovení polyakrylamidu ve vzorcích vody pomocí resonančního Rayleighova rozptylu záření. Methylenová modř vyvolává apoptosu vybraných rakovinových buněk pomocí NADH a skombinováním s rostlinným auxinem je methylenová modř zkoumána ohledně fotodynamické léčby rakoviny [48].

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

- Azur B, 3-methylamino-7-dimethylaminofenothiazin chlorid 89% barvivo, $M = 305,83 \text{ g mol}^{-1}$, (Sigam-Aldrich, Německo)
- Azur A 3-amino-7-dimethylaminofenothiazin chlorid 80% barvivo, $M = 291,80 \text{ g mol}^{-1}$, (Sigma-Aldrich, Německo)
- Methylenová modř, 3,7-bis(dimethylamino)fenothiazin chlorid p.a., $M = 373,19 \text{ g mol}^{-1}$ (Lachema, Brno)
- Oranž III, 4-[(4-dimethylamino)fenyldiazenyl]benzénsulfonát sodný p.a., $M = 327,34 \text{ g mol}^{-1}$ (Lachema, Brno)
- Bromfenolová modř, 3',3'',5',5''-tetrabromfenolsulfoftalein p.a., $M_r = 670,02 \text{ g mol}^{-1}$ (Lachema, Brno)
- Bromkresolová zeleň, 3',3'',5',5''-tetrabrom-m-kresolsulfoftalein p.a., $M = 698,07 \text{ g mol}^{-1}$ Lachema, Brno)
- Fenosafranin p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)
- Chondroitin sulfát p.a., (Fluka, Německo)
- Flexodon (Medicom International, ČR) potahované tablety obsahující 200 mg chondroitin sulfátu
- Condrosulf (IBI spol s r.o., ČR) tobolka s obsahem 400 mg chondroitin sulfátu
- Altermed mobilin (Altermed, ČR) jedna dávka (prášek 6 g) obsahuje 50 mg chondroitin sulfátu
- Hydroxid sodný, p.a. (Lach-Ner, ČR)
- Kyselina chlorovodíková 37% p.a. (Sigma-Aldrich, Německo)

3.1.1 Příprava roztoků

Byl připraven zásobní roztok chondroitin sulfátu navážením 10 mg pevného chondroitinu sulfátu, jeho kvantitativním převedením do 100ml odměrné baňky a doplněním po rysku destilovanou vodou. Tím vznikl zásobní roztok o koncentraci 100 mg l^{-1} . Tento roztok byl uchováván při teplotě $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ v temnu. Dále používané

roztoky příslušné koncentrace byly připravovány naředěním tohoto zásobního roztoku destilovanou vodou.

K dispozici byly zásobní roztoky methylenové modře, azuru B a azuru A, všechny o koncentraci $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, připraveny byly navážením 9,4 mg methylenové modře, 7,6 mg azuru B a 7,3 mg azuru A, kvantitativním převedením do 50ml odměrných baněk a doplněním po rysku destilovanou vodou.

Reálné vzorky farmaceutických výrobků byly připraveny rozpuštěním tablet nebo práškové formy v destilované vodě. V případě Condrosulfu byla tableta rozpuštěna ve 100ml odměrné baňce a byl tak získán roztok o koncentraci $4,0 \text{ g l}^{-1}$ chondroitin sulfátu. Tableta Flexodonu byla rozpuštěna v baňce o objemu 100 ml a výsledná koncentrace byla $2,0 \text{ g l}^{-1}$ chondroitin sulfátu. Altermed mobilin v podobě prášku byl rozpuštěn v 50ml odměrné baňce a získán tak roztok o koncentraci $1,0 \text{ g l}^{-1}$ chondroitin sulfátu.

3.2 Použité přístroje

- Spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent, USA) k němuž je připojen počítač s ovládacím programem UV-Visible ChemStation ver. 9.01, přístroj byl využit k naměření absorpčních spekter pomocí křemenné kyvety s délkou absorpčního prostředí 1 cm
- Přístroj pro sekvenční injekční analýzu FIALab 3500 (FIALab, USA)
- Spektrofotometr HR 4000 (Ocean Optic, USA) se zdrojem záření DT-MINI-2-GS, optickými vlákny připojen k průtokové detekční cele o tloušťce 1 cm, detektor integrovaný v systému SIA
- Počítač vybavený ovládacími programy FIALab (Windows 5.0) a SpectraSuite pro záznam a vyhodnocování dat z detektoru
- Zařízení na přípravu deionizované vody

3.3 Uspořádání aparatury, detekce a ovládání

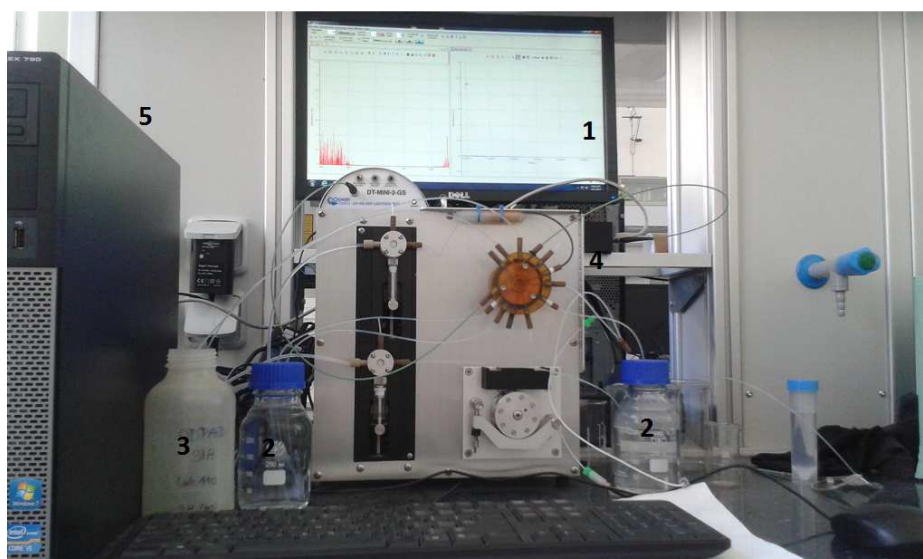
Aparatura SIA používaná pro stanovení chondroitin sulfátu reakcí s fenothiazinovými barvivy se spektrofotometrickou detekcí byla sestavena z pístové pumpy, dvoucestného ventilu, mísící cívky, osmicestného selekčního ventilu se

zaintegrovanou průtokovou detekční celou, spektrofotometru, zdroje záření a počítače s ovládacím softwarem. Jednotlivé části (oba ventily, mísící cívka) tohoto systému jsou spojené teflonovými kapilárami, které tvoří tento průtokový systém a mají průměr 0,5 mm.

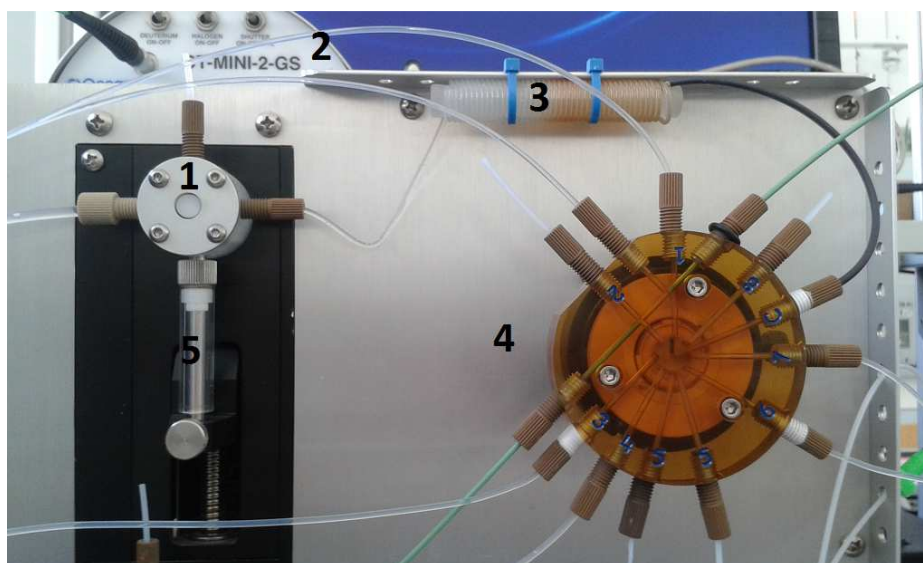
Jako nosný roztok je v této práci používána deionizovaná voda, do níž byl dávkován roztok chondroitin sulfátu a barvivo azur B. Program pro stanovení chondroitin sulfátu metodou SIA byl sestaven z následujících kroků. Nejdříve byl dvoucestný ventil přepnut směrem k mísící cívce, poté byl selekční ventil přepnut do polohy 6 pro nasávání vzorku a pomocí pístové pumpy bylo nasáto zvolené množství roztoku vzorku. Poté byl selekční ventil posunut do polohy 3 pro nasávání barviva a stejným postupem bylo nasáto zvolené množství roztoku barviva. Nakonec byl selekční ventil přepnut opět do polohy 3 pro vzorek a pomocí pumpy byl nasát zvolený objem vzorku. Reakční směs tedy byla tvořena zónou analytu, barviva a opět analytu, vše obklopené deionizovanou vodou. Objem vzorku byl nahrazen deionizovanou vodou nasátou z polohy 4 v tom případě, když bylo potřeba proměřit jen slepý vzorek (blank). V dalším kroku byl dvoucestný ventil přepnut do polohy pro nasávání nosného roztoku, pohybem pístové pumpy byl nasán takový objem deionizované vody, aby se doplnil celý objem pístové pumpy, ten tvořil 1,0 ml. Všechny kroky nasávání probíhaly při průtokové rychlosti $25 \mu\text{l s}^{-1}$. Následně byl dvoucestný ventil přepnut směrem k mísící cívce a selekční ventil do polohy 2 směrem k průtokové cele. Tím byl obrácen směr toku. Rychlostí $40 \mu\text{l s}^{-1}$ byl celý objem 1,0 ml se vzniklým produktem transportován přes průtokovou celu, kde byla měřena absorbance protékajícího roztoku, který dále směřoval do odpadu. Absorpční signál z průtokové cely byl přenášen optickými vlákny do detektoru a následně zobrazen na obrazovce ovládacího zařízení jako závislost absorbance při zvolené vlnové délce na čase.

Nakonec byl opět obrácen směr dvoucestného ventilu a nasáta deionizovaná voda do objemu 0,75 ml. Pomocí pístové pumpy byl objem vody opět transportován přes mísící cívku a detekční celu, a tak byla cesta vzorku promyta a připravena k dalšímu měření. Celý pracovní cyklus trval cca 1,5 min.

Na obr. 3.1 je znázorněná celá aparatura SIA a na obr. 3.2 je detail obou ventilů, mísící cívky, zdroje záření a pístové pumpy.



Obr. 3.1: Aparatura SIA, 1 – obrazovka s výsledným signálem, 2 – zásobníky na nosný roztok, 3 – odpad, 4 – spektrofotometrický detektor, 5 – řídicí počítač



Obr. 3.2: Části SIA aparatury, 1 – dvoucestný ventil, 2 – zdroj záření, 3 – mísicí cívka, 4 – selekční ventil, 5 – pístová pumpa s objemem 1 ml

3.4 Statistické zpracování výsledků

Všechna data naměřená v této práci byla zpracována dle běžných statistických pravidel [60].

Aritmetický průměr

Používá se pro větší soubory dat, téměř zcela odstraňuje vliv náhodných chyb. Není vhodný pro menší skupiny dat, jeho robustnost zde není velká. Vypočítá se jako součet všech naměřených výsledků ($x_1 - x_n$) dělený počtem naměřených výsledků n .

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (3.1)$$

Medián

Používá se pro menší soubory měření, právě tam kde není vhodné použít aritmetický průměr. Medián je střední hodnota z daného podle velikosti seřazeného souboru dat. V případě, že je soubor lichý se bere jako medián prostřední hodnota a v případě sudého souboru dat se vezmou dvě prostřední hodnoty a udělá se z nich aritmetický průměr.

Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka vyjadřuje míru přesnosti měřeného souboru dat n , charakterizuje tedy náhodné chyby. Její hodnota se určí jako odmocnina sumy čtverců odchylek jednotlivých měření dělená počtem měření zmenšeným o jednu ($n - 1$).

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (3.2)$$

Relativní směrodatná odchylka

Relativní směrodatná odchylka je charakteristika relativní hodnoty náhodné chyby. Vypočítá se jako poměr hodnoty směrodatné odchylky a aritmetického průměru, případně mediánu. Jeho jednotkou jsou procenta.

$$s_r(\%) = 100 \frac{s}{\bar{x}} \quad (3.3)$$

Deanův a Dixonův test

Ke zjištění odlehlosti výsledků byl použit Dean-Dixonův test. Ze souboru v zestupně seřazených dat můžeme tímto testem vyřadit výsledky shledané jako odlehlé. Podle Dean-Dixonova testu se vypočítá hodnota Q , která se poté srovnává s tabelovanými kritickými hodnotami. Pokud je parametr Q větší než tyto kritické hodnoty, je výsledek odlehlý a vyřadí se ze souboru dat. Hodnota Q se vypočte podle vzorce:

$$Q = \frac{|x_{(i)} - x_{(i-1)}|}{x_n - x_1} \quad (i) = 1; n \quad (3.4)$$

Zpracování naměřených dat

Mez detekce je nejnižší možné množství analytu ve vzorku, které může být danou analytickou metodou detekováno a byla počítána podle vztahu

$$LOD = 3s_B, \quad (3.5)$$

kde LOD je mez detekce analytu a s_B je směrodatná odchylka vzorku s malým přídatkem CS.

Mez stanovitelnosti je nejnižší možné množství analytu ve vzorku, které může být danou analytickou metodou kvantitativně stanoveno a byla počítána podle vztahu

$$LOQ = 10s_B, \quad (3.6)$$

kde LOQ je mez stanovitelnosti analytu a s_B je směrodatná odchylka vzorku s malým přídatkem CS.

4 Výsledky měření a diskuze

Analytické stanovení chondroitin sulfátu může být založeno na reakci s některými fenothiazinovými barvivy. Protože se jedná vesměs o kationtová barviva vyznačující se kladným nábojem ve vodném roztoku, je zmíněné stanovení založeno na vzniku iontového asociátu mezi stanovovaným chondroitinem a příslušným barvivem. Vznik asociátu se významně projeví ve změně absorpčního spektra barviva ve viditelné oblasti, což je patrné i při pohledu na dvojici roztoků s různým obsahem chondroitinu. Pokles absorbance v maximu vlnové délky příslušného barviva lze využít jako analytický signál, jehož velikost závisí na koncentraci přítomného analytu. V následující části práce jsou uvedeny dva způsoby stanovení chondroitinu založené na výše popsaném principu. Jedná se o statické a průtokové uspořádání. Statické uspořádání bylo provedeno především za účelem nalezení a ověření optimálních reakčních podmínek a následného porovnání charakteristik průtokového uspořádání.

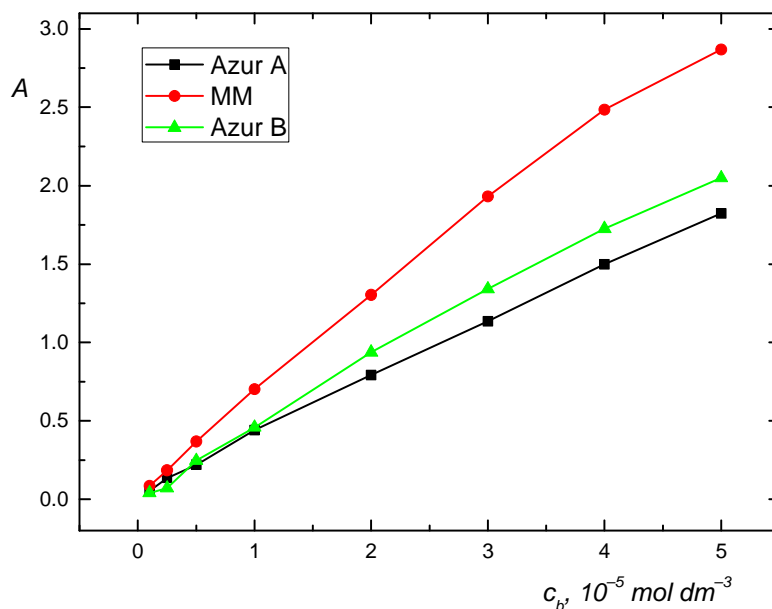
4.1 Statické uspořádání

Vzhledem ke své experimentální jednoduchosti byly nejprve experimenty provedeny ve statickém uspořádání. V tomto uspořádání bylo studováno, jak se chová roztok samotného barviva a roztok barviva v přítomnosti analytu ve viditelné části elektromagnetického spektra. Pro další experimenty bylo třeba optimalizovat především koncentraci barviva. Za optimálních podmínek byla naměřena kalibrační závislosti s narůstající koncentrací chondroitin sulfátu (v grafech uveden jako „CS“) a zjistit, zda má na stanovení nějaký vliv hodnota pH prostředí. Získané poznatky byly aplikovány na měření reálných vzorků farmaceutických přípravků a vzorků s biologickou maticí.

4.1.1 Optimalizace koncentrace barviva

Jako první byla zjištěna závislost absorbance na koncentraci barviv azuru B, azuru A a methylenové modře ve vodném roztoku. Byly měřeny koncentrace barviv v oblasti $0,1 \cdot 10^{-5}$ až $5,0 \cdot 10^{-5}$ mol dm⁻³. Naměřené závislosti jsou znázorněny na obr. 4.1. Optimalizace byly prováděny za účelem zjištění optimální koncentrace barviva, při které není dosaženo velké hodnoty absorbance, což by způsobovalo poměrně velké

chyby při stanovení. Na druhou stranu je vhodné zvolit takovou koncentraci, pro níž je při zvolené vlnové délce detekce analytického signálu hodnota absorbance dostatečně vysoká pro detekci jejího poklesu v přítomnosti analytu.



Obr. 4.1: Závislost absorbance na koncentraci barviva azuru B, azuru A a methylenové modře (MM)

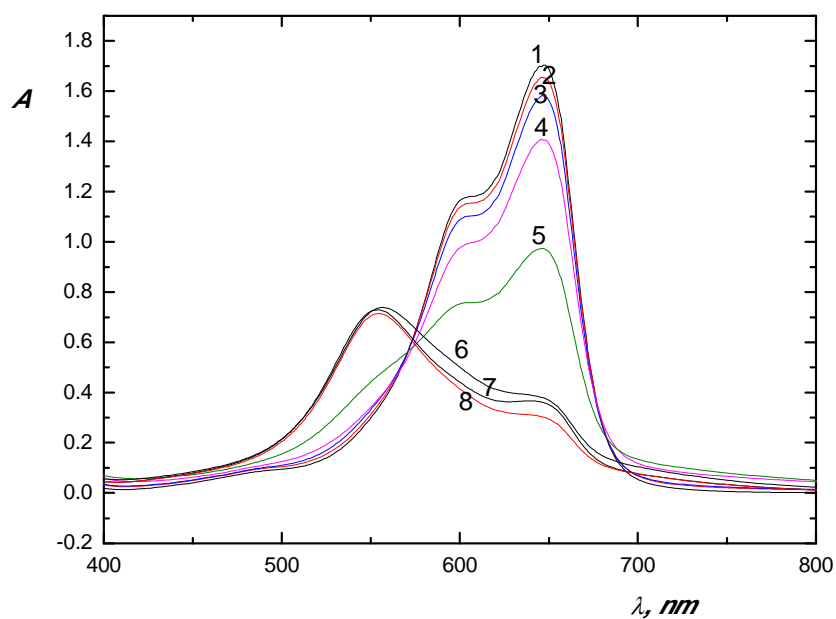
Koncentrace barviv 0,10; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 a 5,0 · 10⁻⁵ mol dm⁻³

Jak je patrné z obr. 4.1, závislost absorbance na koncentraci barviv ve vodném roztoku je u všech barviv téměř lineární v celém proměřovaném rozsahu. Z grafu je patrné, že vyšších signálů bylo získáno při stejné koncentraci barviv pro methylenovou modř. Při stejné koncentraci dosahují signály Azuru A pouhých 59 % signálů methylenové modři. Vybraná optimální koncentrace všech třech barviv byla pro další měření $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

4.1.2 Kalibrační závislosti

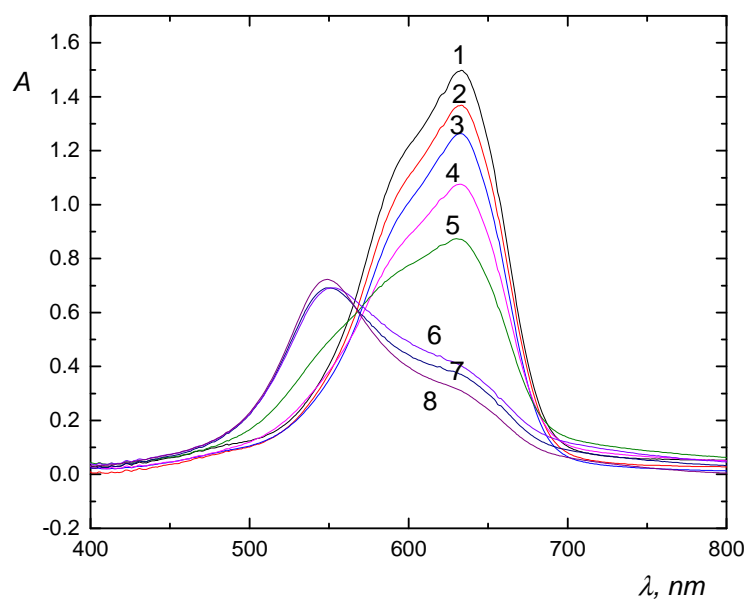
Dále bylo nezbytné proměřit absorpční spektra všech třech čistých barviv a nalézt absorpční změny v roztocích těchto barviv v přítomnosti chondroitin sulfátu. Byla měřena velikost změny absorbance barviv a roztoku barviv s chondroitin sulfátem při konkrétních vlnových délkách. Při tomto měření byla koncentrace barviv $4,0 \cdot 10^{-5}$

mol dm^{-3} . Koncentrace chondroitin sulfátu byla přidávána v rozsahu od 0,0 do $20,0 \text{ mg l}^{-1}$. Na obr. 4.2, 4.3 a 4.4 jsou znázorněny kalibrační závislosti barviv azuru B, azuru A a methylenové modře, které ukazují pokles absorbance po přidavku chondroitin sulfátu.

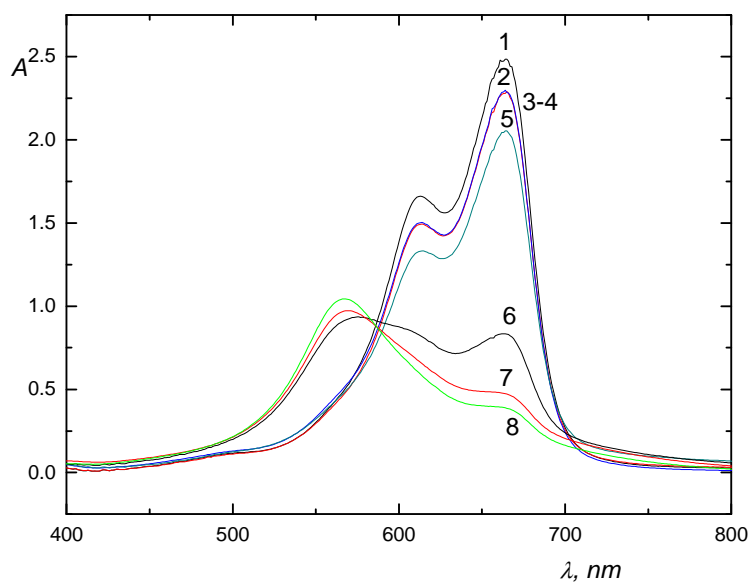


Obr. 4.2: Závislost absorbance azuru B na koncentraci chondroitin sulfátu

Roztok barviva azuru B o koncentraci $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ s přidavkem koncentrací chondroitin sulfátu (1 - 0; 2 - 0,5; 3 - 1,0; 4 - 2,5; 5 - 5,0; 6 - 10,0; 7 - 15,0 a 8 - $20,0 \text{ mg l}^{-1}$).



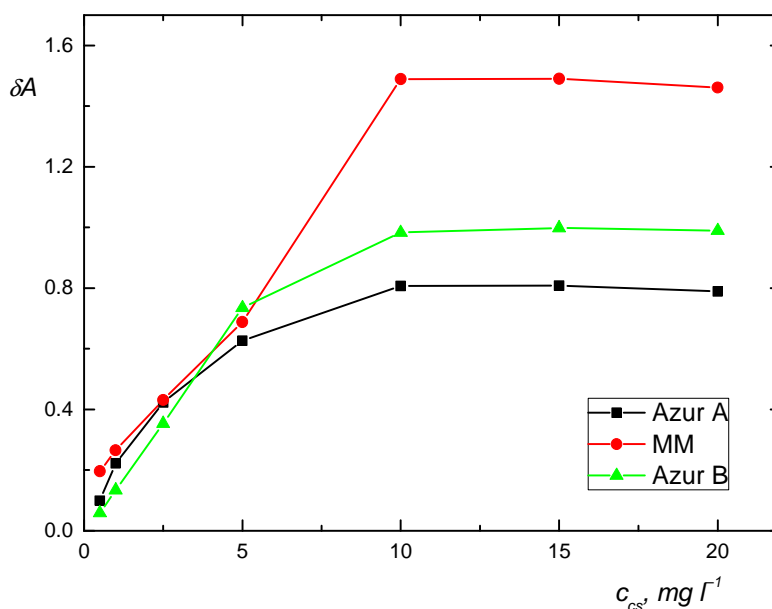
Obr. 4.3: Závislost absorbance azuru A na koncentraci chondroitin sulfátu
Azur A o koncentraci $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ s přidavkem koncentrací chondroitin sulfátu (1 - 0; 2 - 0,5; 3 - 1,0; 4 - 2,5; 5 - 5,0; 6 - 10,0; 7 - 15,0 a 8 - 20,0 mg l^{-1}).



Obr. 4.4: Závislost absorbance MM na koncentraci chondroitin sulfátu
Methylenová modř o koncentraci $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ s přidavkem koncentrací chondroitin sulfátu (1 - 0; 2 - 0,5; 3 - 1,0; 4 - 2,5; 5 - 5,0; 6 - 10,0; 7 - 15,0 a 8 - 20,0 mg l^{-1}).

Z výše uvedených obr. 4.2, 4.3 a 4.4 je vidět, že barviva mají v proměřované oblasti vlnových délek jedno nebo dvě absorpční maxima, avšak po přidání chondroitin sulfátu absorbance poklesne a vytvoří se nová absorpční maxima. Jako absorpční maximum barviva azuru B byla odečtena vlnová délka 646 nm, u azuru A 632 nm a u methylenové modře 663 nm.

Dále bylo nutno sledovat průběh závislosti změny absorbance na koncentraci přidávaného chondroitin sulfátu. Tato závislost byla proměřena v rozmezí koncentrací chondroitin sulfátu 0,5 – 20,0 mg l⁻¹ při koncentraci barviv 4,0·10⁻⁵ mol dm⁻³ a je znázorněna na obr. 4.5.



Obr. 4.5: Závislost růstu rozdílu absorbance barviva azuru B, azuru A a methylenové modře a absorbance barviva s chondroitin sulfátem

Koncentrace barviv 4,0·10⁻⁵ mol dm⁻³, přidávané koncentrace CS 0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 a 20,0 mg l⁻¹.

Z křivek na obr. 4.5 je vidět, jak zpočátku rozdíl absorbance strmě roste a při vyšších koncentracích chondroitin sulfátu stagnuje a dále už se nezvětšuje.

V tabulce 4.1 jsou shrnuty základní charakteristiky stanovení chondroitin sulfátu ve statickém uspořádání.

Tab. 4.1: Základní charakteristiky stanovení chondroitin sulfátu ve statickém uspořádání

	Azur A	Azur B	MM
LOD (mg l^{-1})	0,33	0,51	0,23
LOQ (mg l^{-1})	1,12	1,58	0,76
citlivost (l mg^{-1})	0,1772	0,1452	0,1502
opakovatelnost (%)	3,8	4,8	2,4
korelační koeficient	0,9907	0,9997	0,9735
lineár. dynam. rozsah (mg l^{-1})	do 5,0	do 5,0	do 5,0
pracovní rozsah (mg l^{-1})	1,1-10,0	1,6-10,0	0,8-10,0

Z parametrů uvedených v tabulce 4.1 lze vyvodit, že nejnižší mez detekce i stanovitelnosti chondroitin sulfátu je dosaženo v případě stanovení pomocí methylenové modře, toto stanovení se vyznačuje i nejnižší opakovatelností. Naopak nejcitlivější je stanovení pomocí azuru A. Lineární dynamické rozsahy a pracovní rozsahy jsou téměř totožné.

4.1.3 Další reakční činidla

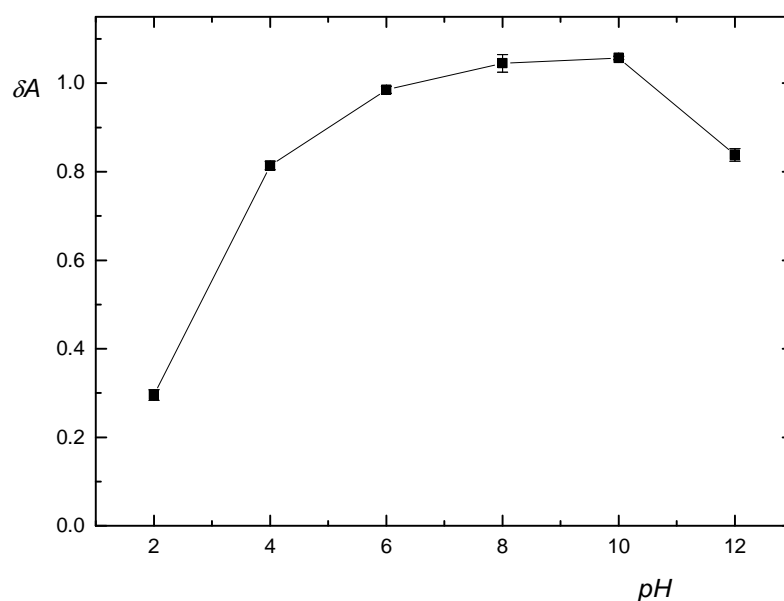
V další části práce byla vyzkoušena některá další vybraná barviva, zda reagují s chondroitin sulfátem podobně jako doposud aplikovaná barviva a mohla by tedy být použita jako alternativní reakční činidla pro jeho stanovení. Byla vybrána tato barviva: oranž III indikátor, bromfenolová modř indikátor, bromkresolová zeleň a fenosafranin. Po proměření roztoku samotného barviva a barviva s chondroitin sulfátem nebyl zjištěn žádný pokles absorbance u všech uvedených barviv a tudíž byl vyvozen závěr, že tato uvedená barviva nereagují s analytem principem popsaným výše a již jim v této práci nebyla věnována dále pozornost.

4.1.4 Vliv pH

V neposlední řadě byl sledován i vliv hodnoty pH prostřední na stanovení chondroitin sulfátu. Byly připraveny stejné koncentrace barviva azuru B ($4,0 \cdot 10^{-5}$ mol

dm^{-3}) a chondroitin sulfátu ($6,0 \text{ mg l}^{-1}$) a pH těchto roztoků bylo upraveno v rozmezí od 2 do 12 jednotek pH s krokem po 2 jednotkách pH, hydroxidem sodným a zředěnou kyselinou chlorovodíkovou. Závislost změny absorbance na pH je znázorněna na obr. 4.6.

Z obr. 4.6 je možné usoudit, že změna absorbance je jen málo závislá na pH v rozmezí 6 – 10 jednotek. V kyselém a ve výrazně zásaditém prostředí tvorba iontového asociátu probíhá jenom s malou účinností na rozdíl od již zmíněného rozmezí pH 6 – 10. Tento závěr přináší výhodu v tom, že se nemusí udržovat pH striktně na určité hodnotě pomocí příslušných pufrů, které navíc v mnoha případech stanovení ruší, ale je možné si dovolit pracovat v celém rozsahu 6 – 10 pH. Pro dosažení maximálních změn absorbance postačí pohybovat se v neutrálním pH.



Obr. 4.6: Závislost rozdílu absorbance na pH

Koncentrace barviva azuru B $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, koncentrace CS $6,0 \text{ mg l}^{-1}$, měřená oblast pH 2, 4, 6, 8, 10 a 12.

4.1.5 Analýza reálných vzorků

Součástí této práce je i stanovení koncentrace chondroitin sulfátu v reálných vzorcích farmaceutických přípravků. K dispozici byly tyto přípravky: Condrosulf 400 –

tableta (obsah 400 mg CS), Flexodon – tableta (obsah 200 mg CS) a Altermed mobilin – prášek (obsah 50 mg CS). Tyto tablety a prášek byly rozpuštěny ve vodě a připraveny tak zásobní roztoky pro další použití. Byly použity dvě metody k tomuto stanovení. Pro metodu kalibrační přímky byly připraveny roztoky, v nichž skutečná koncentrace analytu dosahovala $4,0 \text{ mg l}^{-1}$. Pro metodu standardního přídatku byly připraveny roztoky o koncentraci analytu $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ s přídatkem 1,0; 2,0 a $3,0 \text{ mg l}^{-1}$ standardu chondroitin sulfátu. Koncentrace azuru B v obou metodách byla $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. V tabulkách 4.2 a 4.3 můžeme vidět porovnání skutečných a naměřených koncentrací.

Tabulka 4.2: Stanovení CS, metoda kalibrační křivky

vzorek	skutečná c_{CS}	vypočítaná c_{CS}
	mg l^{-1}	mg l^{-1}
Condrosulf	4,0	$5,0 \pm 0,8$
Flexodon	4,0	$4,7 \pm 0,4$
Altermed	4,0	$0,7 \pm 0,3$

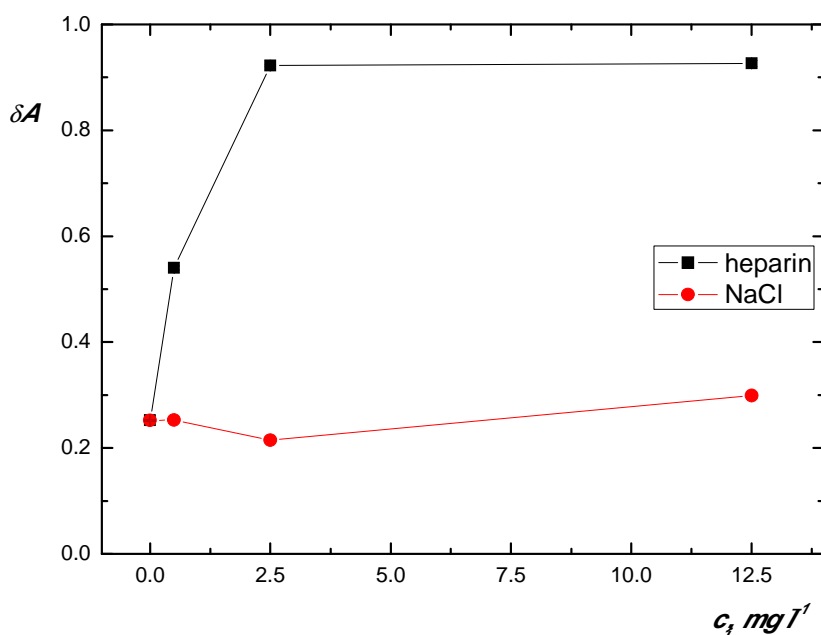
Tabulka 4.3: Stanovení CS, metoda standardního přídatku

vzorek	skutečná c_{CS}	vypočítaná c_{CS}
	mg l^{-1}	mg l^{-1}
Condrosulf	2,0	$3,4 \pm 0,2$
Flexodon	2,0	$2,5 \pm 0,5$
Altermed	2,0	$1,4 \pm 0,4$

Z naměřených a spočítaných hodnot obou metod lze vyvodit, že obě metody poskytují relativně různé výsledky v závislosti na analyzovaném vzorku a použité metodě. Naměřené a vypočítané hodnoty s ohledem na interval spolehlivosti se liší ve většině případů jen málo od deklarované hodnoty. Poslední vzorek Altermed vykazoval menší koncentrace u obou metod, což může být způsobeno složitější chemickou maticí tohoto vzorku. Z tohoto důvodu byla na závěr statického uspořádání provedena interferenční studie.

4.1.6 Vliv interferentů

Pozornost byla tedy dále zaměřena na interferenční studii, kdy jako zástupce interferujících látek byl vybrán heparin a chlorid sodný. Heparin protože je podobný analytu a chlorid sodný jako zástupce běžně se vyskytující soli. Proměřeny byly roztoky s koncentrací $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ chondroitin sulfátu v $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ azuru A s přidavkem 0; 0,5; 2,5 a $12,5 \text{ mg l}^{-1}$ heparinu nebo chloridu sodného. Závislost změny absorbance na koncentraci těchto přidávaných interferenčních látek můžeme vidět na obr. 4.7.



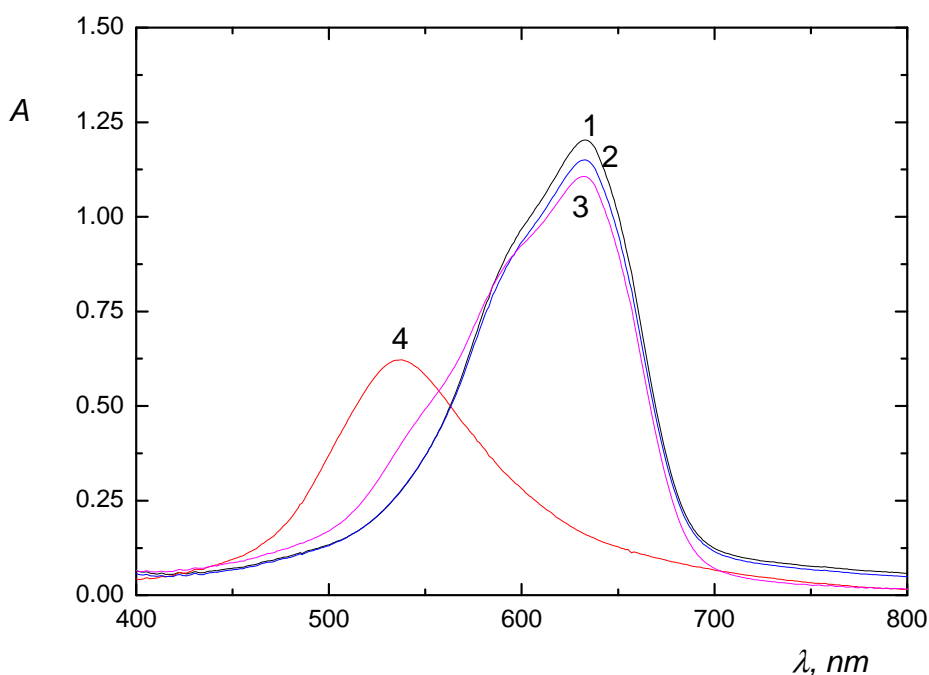
Obr. 4.7: Závislost změny absorbance na koncentraci interferentů

Reakční čas 0 s, dávkovaný objem $100 \mu\text{l}$ CS + $50 \mu\text{l}$ azuru A + $100 \mu\text{l}$ CS, koncentrace azuru A $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ a průtoková rychlost $40 \mu\text{l s}^{-1}$, koncentrace heparinu a NaCl 0; 0,5; 2,5; a $12,5 \text{ mg l}^{-1}$.

Z obr. 4.7 lze vyčíst, že chlorid sodný stanovení chondroitin sulfátu téměř nijak neovlivňuje, kdežto heparin velmi výrazně zvyšuje rozdíl mezi signálem samotného chondroitin sulfátu a přidávaného heparinu i při nízkých koncentracích heparinu.

Projev interferujících látek lze demonstrovat na obr. 4.8, kde je vynesena závislost absorbance na vlnové délce. Křivka 1 značí roztok chondroitin sulfátu, křivka

2 ukazuje signál chondroitin sulfátu s chloridem sodným, křivka 3 znázorňuje signál chondroitin sulfátu v moči a křivka 4 značí chondroitin sulfát a heparin.



Obr. 4.8: Srovnání různých interferujících látek

Koncentrace barviva azuru A $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, koncentrace CS $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ v každém vzorku, 1 – $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ CS, 2- $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ CS + $12,5 \text{ mg l}^{-1}$ NaCl, 3 – $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ + moč, 4 – $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ CS + $12,5 \text{ mg l}^{-1}$ heparin

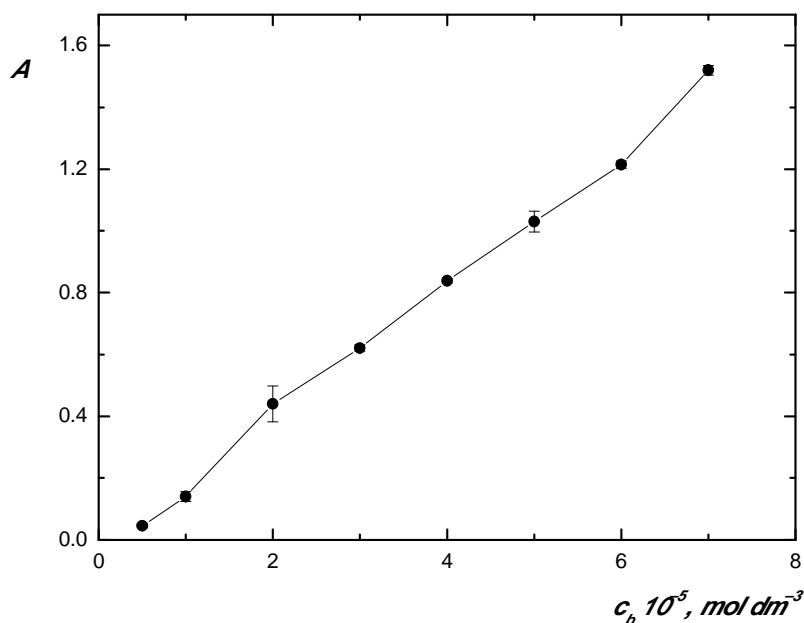
Chondroitin sulfát byl také stanoven ve vzorku moči. Moč byla naředěna 1:9, do takto zředěné moči byl přidán vzorek chondroitin sulfátu o koncentraci $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ v prostředí barviva azuru A o koncentraci $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Změna absorbance má hodnotu 0,315 oproti očekávané hodnotě 0,252. To znamená, že v matrici moči je nějaký interferent, který způsobuje snížení signálu, tedy nárůst změny absorbance.

4.2 Průtokové uspořádání

V průtokovém SIA uspořádání byly již přímo optimalizovány jednotlivé parametry měření. Pracovalo se zde s barvivem azurem B a výsledky této optimalizace byly poté aplikovány na barviva azur A a methylenovou modř. I v tomto uspořádání byly poznatky získané při optimalizaci použity ke stanovení chondroitin sulfátu v reálných vzorcích. Reálné vzorky byly stejné jako v případě stanovení ve statickém uspořádání.

4.2.1 Optimalizace koncentrací

Nejprve bylo potřeba určit optimální koncentraci barviva azuru B. Pozorována byla tedy absorbance v závislosti na zvyšující se koncentraci barviva. Tato závislost byla proměřena při průtokové rychlosti $25 \mu\text{l s}^{-1}$, reakčním čase 5 s, dávkovaném objemu $250 \mu\text{l}$ a koncentraci barviva od $0,5$ do $7,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Průběh této optimalizace je zaznamenán na obr. 4.9.

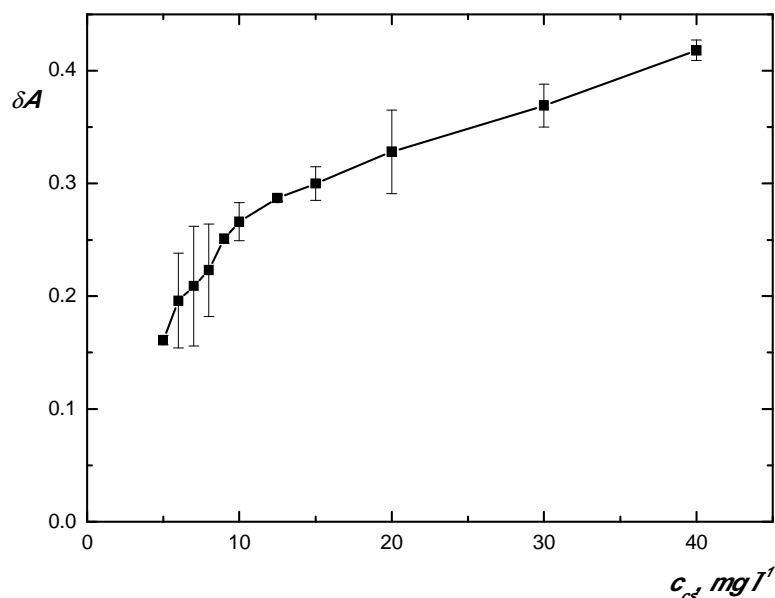


Obr. 4.9: Závislost absorbance na koncentraci barviva azuru B

Byly použity koncentrace azuru B: $0,5$; $1,0$; $2,0$; $3,0$; $4,0$; $5,0$; $6,0$ a $7,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, dávkovaný objem $250 \mu\text{l}$, reakční čas 5 s, průtoková rychlost $25 \mu\text{l s}^{-1}$.

Jako optimální koncentrace byla vybrána $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, protože má absorbanci kolem 1,000, což je dostatečně velká absorbance, aby rozdíly mezi absorbancí barviva a barviva s analytem byly dostatečně patrné a ještě není signál mimo oblast linearity spektrofotometrického měření.

Další krok spočíval ve zjištění vhodné koncentrace chondroitin sulfátu, aby se mohly optimalizovat další parametry měření. Takže byla proměřena závislost změny absorbance v závislosti na koncentraci přidaného chondroitin sulfátu. Tato koncentrace se pohybovala v rozmezí od 5,0 do 40,0 mg l^{-1} a koncentrace azuru B při tom byla $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Závislost byla proměřena při reakčním čase 5 s, dávkovanému objemu 200 μl a průtokové rychlosti 25 $\mu\text{l s}^{-1}$ a je popsána na obr. 4.10.



Obr. 4.10: Závislost změny absorbance barviva azuru B na koncentraci chondroitin sulfátu

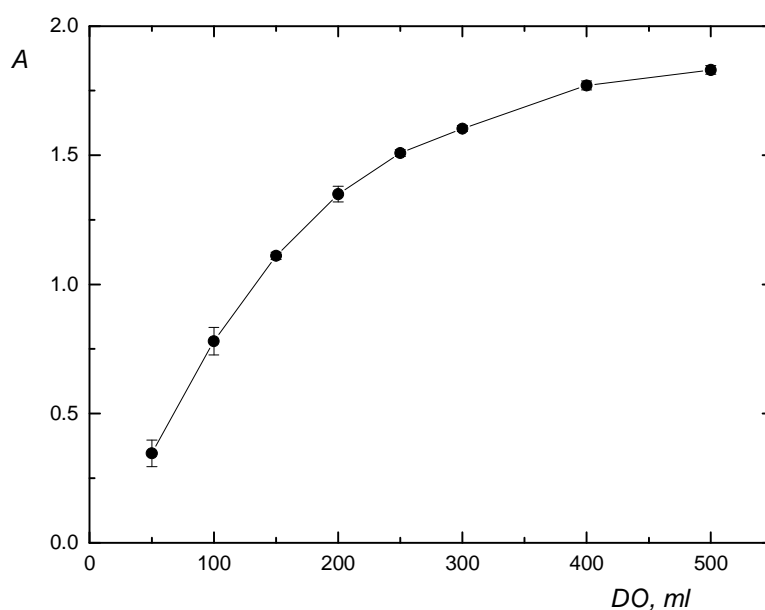
Koncentrace barviva azuru B $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ a koncentrace CS 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 15,0; 20,0; 30,0 a 40,0 mg l^{-1} , dávkovaný objem 200 μl , reakční čas 5s, průtoková rychlost 25 $\mu\text{l s}^{-1}$.

Z tohoto grafu je patrné, že se zvyšující se koncentrací chondroitin sulfátu se zvyšuje rozdíl mezi absorbancemi samotného barviva a barviva s analytem, ale tento rozdíl se nezvyšuje lineárně po celou dobu měření. Při vyšších koncentracích

chondroitin sulfátu už nemá tak strmý průběh. Proto byla jako optimální koncentrace chondroitin sulfátu pro optimalizaci dalších parametrů zvolena $15,0 \text{ mg l}^{-1}$.

4.2.2 Dávkovaný objem

Dalším optimalizovaným parametrem byl dávkovaný objem. Dávkované objemy 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 a 500 μl byly měřeny s koncentrací azuru B $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, průtokovou rychlostí $25 \text{ } \mu\text{l s}^{-1}$ a reakčním časem 5 s, jak je ukázáno na obr. 4.11.



Obr. 4.11: Závislost absorbance na dávkovaném objemu

Měřeny byly tyto dávkované objemy: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 a 500 μl , koncentrace azuru B $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, průtoková rychlost $25 \text{ } \mu\text{l s}^{-1}$ a reakční čas 5 s.

Dávkovaný objem byl za těchto podmínek optimalizován nejprve na objem 200 μl , protože jeho absorbance byla dost vysoká na to, aby byl dobře znatelný pokles absorbance, a přesto ještě byla spotřeba barviva i vzorku únosná. Postupně se ale přišlo na to, že vhodnější bude, když se barvivo v reakční cívce obklopí roztokem vzorku z obou stran, tak se vytvoří více produktu a získá se větší pokles absorbance. Proto byla vybrána tato varianta dávkovaných objemů, jehož výsledky jsou zaznamenány v tabulce 4.4.

Tabulka 4.4: Varianty dávkovaných objemů

CS + barvivo + CS μl	δA %
100 + 100 + 100	48
150 + 100 + 150	44
200 + 100 + 200	32
100 + 50 + 100	46
50 + 10 + 50	Špatný signál
150 + 150 + 150	55
150 + 200 + 150	52
50 + 100 + 50	34
50 + 50 + 50	50
10 + 50 + 10	Špatný signál

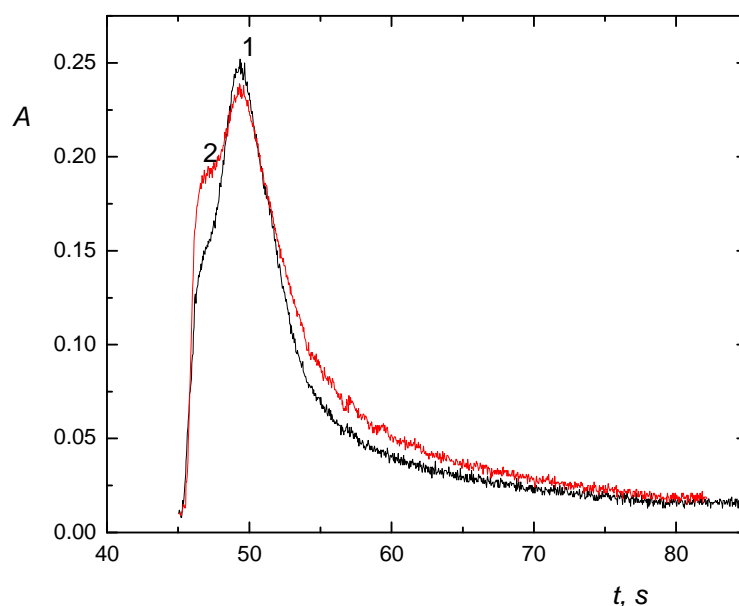
Koncentrace azuru B byla $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, koncentrace CS $15,0 \text{ mg l}^{-1}$, průtoková rychlost 25 μl l^{-1} , reakční čas 5 s.

Po proměření těchto různých kombinací dávkovaných objemů, byla vybrána kombinace 100 μl CS + 50 μl barviva + 100 μl CS. Procentuální rozdíl absorbance nebyl sice nejvyšší, ale v tomto případě, je třeba brát zřetel i na spotřebu reagentu a vzorku. Proto byla vybrána tato kombinace relativně velkého poklesu absorbance a znatelné úspory používaných roztoků.

4.2.3 Reakční čas

Jako další parametr byl sledován vliv reakčního času na rozmývání píků. Reakční čas byl pozorován v rozmezí 0 až 40 s.

Ve vyšších reakčních časech by mohl být očekáván mírný pokles absorbance, díky rozmývání píků. K tomu ale v tomto případě dochází skoro v neznatelné míře, jak ukazuje obr. 4.12. Tato závislost byla proměřena pro koncentraci barviva azuru B $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, pro dávkované objemy 100 μl CS + 50 μl barviva + 100 μl CS, koncentrace CS $15,0 \text{ mg l}^{-1}$.



Obr. 4.12: Porovnání píků při reakčním čase 0 s a 40 s

Dávkovaný objem 100 μl CS + 50 μl azuru B + 100 μl CS, koncentrace azuru B $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, chondroitin sulfátu $15,0 \text{ mg l}^{-1}$, reakční čas 0 a 40 s, průtoková rychlost $25 \text{ } \mu\text{l s}^{-1}$. 1 - 0 s, 2 - 40 s.

Z naměřených hodnot bylo zjištěno, že reakční čas nijak zásadně stanoví chondroitin sulfátu azurem B neovlivňuje a reakce probíhá téměř okamžitě.

Díky tomu, že reakce probíhá téměř okamžitě, bylo možno zvolit jako reakční čas 0 s. Tím se také zkracuje doba trvání jedné analýzy

4.2.4 Průtoková rychlost

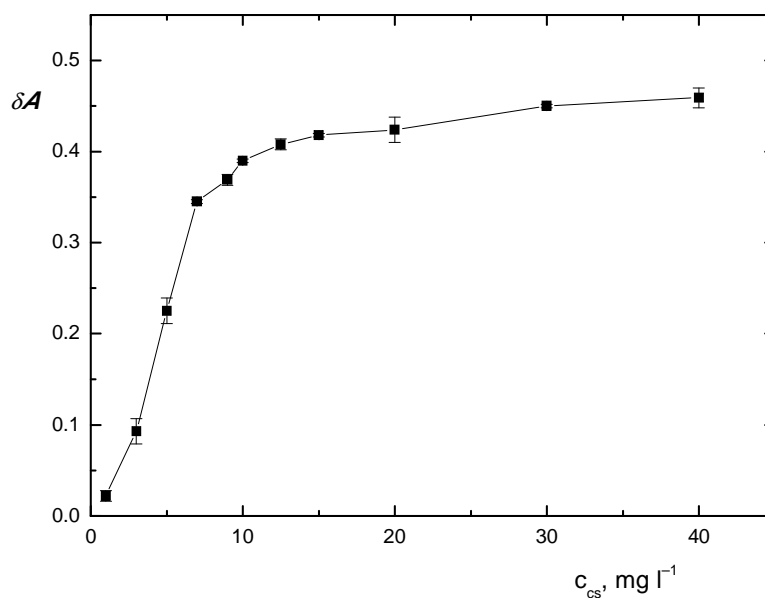
Vliv průtokové rychlosti na stanovení chondroitin sulfátu byl sledován v rozsahu od 5 do $60 \text{ } \mu\text{l s}^{-1}$ při koncentraci barviva azuru B $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, reakčním časem 0 s, dávkovaným objemem 100 μl CS + 50 μl azuru B + 100 μl CS a koncentrací chondroitin sulfátu $15,0 \text{ mg l}^{-1}$.

Průtoková rychlost absorbanci neovlivňuje žádným zásadním způsobem. Při vyšších průtokových rychlostech se častěji objevovaly bubliny v aparatuře, tyto bubliny jsou značný problém, protože znehodnocují výsledný signál v podobě píku. Byla vybrána průtoková rychlost $40 \text{ } \mu\text{l s}^{-1}$, protože tvorba bublin nebyla tak častá, jako při

vyšších rychlostech a zároveň nebyl průběh analýzy zbytečně zdržován. Délka analýzy je další důležitý ukazatel, kterým je potřeba se řídit při optimalizaci parametrů.

4.2.5 Kalibrační závislost

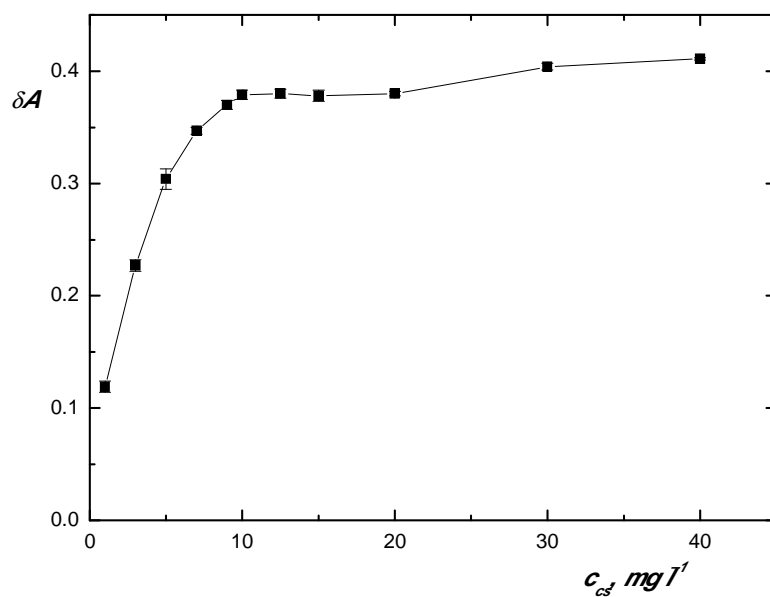
Nakonec byla změřena kalibrační závislost za výše získaných optimálních podmínek tj., reakční čas 0 s, dávkovaný objem 100 μl CS + 50 μl azuru B + 100 μl CS, koncentrace azuru B $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, průtoková rychlost 40 $\mu\text{l s}^{-1}$, koncentrace chondroitin sulfátu 0; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 9,0; 10,0; 12,5; 15,0; 20,0; 30,0 a 40,0 mg l^{-1} . Tato závislost je znázorněna na obr. 4.13.



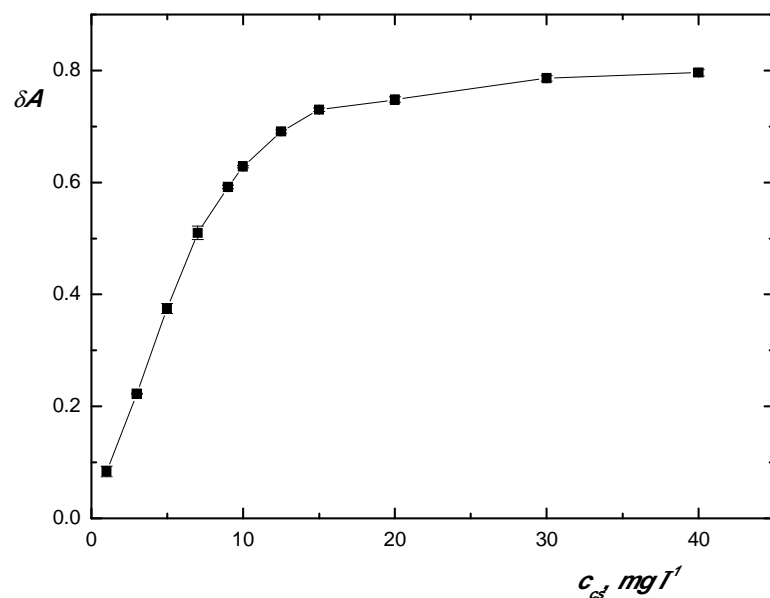
Obr. 4.13: Velikost poklesu absorpance barviva azuru B v závislosti na koncentraci chondroitin sulfátu

Reakční čas 0 s, dávkovaný objem 100 μl CS + 50 μl azuru B + 100 μl CS, koncentrace azuru B $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ a průtoková rychlost 40 $\mu\text{l s}^{-1}$.

Při stejných optimalizovaných podmínkách byla změřena kalibrace i pro barvivo azur A o koncentraci $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, kterou ukazuje obr. 4.14 a pro barvivo methylenovou modř o stejné koncentraci na obr. 4.15.



Obr. 4.14: Závislost změny absorbance barviva azuru A na koncentraci CS
Reakční čas 0 s, dávkovaný objem 100 μl CS + 50 μl azuru B + 100 μl CS, koncentrace azuru A $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ a průtoková rychlost $40 \mu\text{l s}^{-1}$.



Obr. 4.15: Závislost změny absorbance barviva MM na koncentraci CS
Reakční čas 0 s, dávkovaný objem 100 μl CS + 50 μl methylenové modře + 100 μl CS, koncentrace methylové modře $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ a průtoková rychlost $40 \mu\text{l s}^{-1}$.

Tabulka 4.5: Parametry kalibračních přímek pro průtokové stanovení chondroitin sulfátu

	Azur A	Azur B	MM
LOD (mg l^{-1})	0,34	0,69	0,39
LOQ (mg l^{-1})	1,01	2,21	1,24
citlivost (l mg^{-1})	0,0663	0,0457	0,0738
opakovatelnost (%)	1,9	4,4	2,2
korelační koeficient	0,9746	0,9879	0,9997
linear. dynam. rozsah (mg l^{-1})	do 7,0	do 7,0	do 9,0
pracovní rozsah (mg l^{-1})	1,0-9,0	2,2-15,0	1,2-15,0

Parametry kalibračních přímek uvedených v tabulce 4.5 ukazují, že nejnižší mez detekce a stanovitelnosti je dosaženo při stanovení chondroitin sulfátu pomocí azuru A, také opakovatelnost je nejlepší. Avšak pracovní rozsah u tohoto stanovení je menší než u dalších dvou barviv. Stanovení pomocí methylenové modře se vyznačuje největším lineárním dynamickým a pracovním rozsahem, toto stanovení je však nejméně citlivé. Stanovení pomocí azuru B je sice nejcitlivější, ale má nejvyšší mez detekce a stanovitelnosti a také nejhorší opakovatelnost.

4.2.6 Reálné vzorky

Stejně jako ve statické části byly reálné vzorky proměřeny i v průtokovém uspořádání. Použity byly stejné vzorky jako ve statickém uspořádání a stejné metody. V případě metody kalibrační křivky byla skutečná koncentrace analytů ve vzorku $8,0 \text{ mg l}^{-1}$ a v případě metody standardního přídatku $4,0 \text{ mg l}^{-1}$. V tabulce 4.6 a 4.7 lze vidět srovnání skutečných a naměřených hodnot koncentrací reálných vzorků.

Tabulka 4.6: Výsledky metody kalibrační křivky

vzorek	skutečná c_{cs}	vypočítaná c_{cs}
	mg l ⁻¹	mg l ⁻¹
Condrosulf	8,0	9,1 ± 0,3
Flexodon	8,0	12,8 ± 0,5
Altermed	-	-

Tabulka 4.7: Výsledky metody standardního přídávku

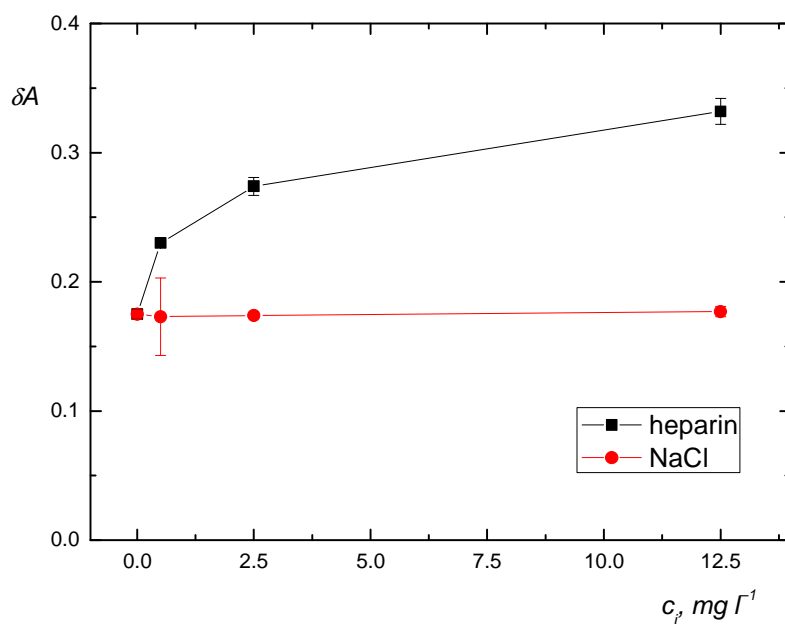
vzorek	skutečná c_{cs}	vypočítaná c_{cs}
	mg l ⁻¹	mg l ⁻¹
Condrosulf	4,0	9,1 ± 0,7
Flexodon	4,0	11,7 ± 0,8
Altermed	-	-

Jak je vidět z tabulek 4.6 a 4.7 metoda kalibrační křivky poskytla přesnější výsledky a zároveň je tato metoda méně náročná na přípravu vzorků. Je tedy vhodnější pro toto stanovení.

Vzorek altermed poskytoval větší signál než blank, takže jeho hodnota se těmito metodami nedá stanovit. Může to být způsobené interferenčními látkami přítomnými v matrici.

4.2.7 Interferenční látky

V průtokovém uspořádání byly také proměřeny přídatky interferenčních látek heparinu a chloridu sodného. Připraveny byly roztoky s 2,5 mg l⁻¹ chondroitin sulfátu v 5,0·10⁻⁵ mol dm⁻³ azuru A s přídávkem 0; 0,5; 2,5 a 12,5 mg l⁻¹ heparinu nebo chloridu sodného. Vliv těchto interferentů je patrný v obr. 4.16.

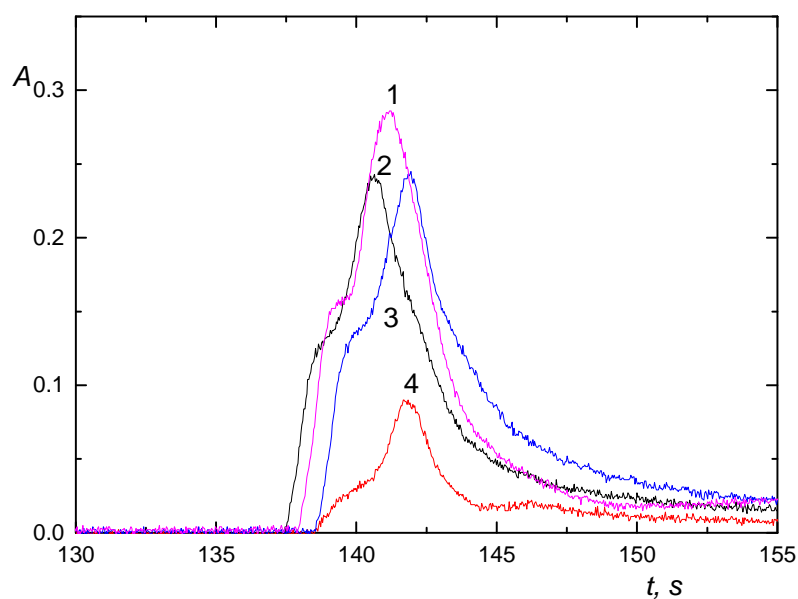


Obr. 4.16: Závislost změny absorbance na koncentraci interferentů

Reakční čas 0 s, dávkovaný objem 100 μl CS + 50 μl azuru A + 100 μl CS, koncentrace azuru A $5,0 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} a průtoková rychlost 40 μl s^{-1} , koncentrace heparinu a NaCl 0; 0,5; 2,5; a 12,5 mg l^{-1} .

Průběh těchto dvou křivek je stejný jako v případě statického uspořádání. Vliv chloridu sodného je zanedbatelný, zato heparin je velmi významný interferent a toto stanovení zásadně ovlivňuje.

Změřen byl také analyt ve vzorku moči (křivka 1, obr. 4.17). Změna absorbance získaného signálu měla menší hodnotu (0,136) než roztok obsahující pouze chondroitin sulfát (0,230), což znamená, že může být přítomen interferent ve vzorku moči, který zvyšuje signál a mylně tak působí dojmem, že je ve vzorku méně analytu než ve skutečnosti je. Na obr. 4.17 jsou vidět jednotlivé signály interferenčních látek (křivka 3 – chlorid sodný a křivka 4 - heparin) ve srovnání se signálem, který dává pouze analyt (křivka 2), tedy chondroitin sulfát.



Obr. 4.17: Srovnání signálů interferentů

Koncentrace barviva azuru A $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, koncentrace CS $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ v každém vzorku, 1 – moč, 2- $2,5 \text{ mg l}^{-1}$ CS, 3 – $2,5 \text{ mg l}^{-1} + 12,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ NaCl}$, 4 – $2,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ CS} + 12,5 \text{ mg l}^{-1} \text{ heparin}$

Je zde tedy vidět, že heparin (křivka č. 4) způsobuje velký pokles signálu. Naproti tomu stanovení chondroitin sulfátu v moči dává větší hodnotu absorbance než roztok obsahující pouze samotný chondroitin sulfát, takže lze předpokládat přítomnost takových interferujících látek, které snižují analytický signál. Přítomnost chloridu sodného toto stanovení nijak neovlivňuje, což bylo zjištěno už při měření ve statickém uspořádání.

5 Závěr

Tato diplomová práce měla za úkol optimalizovat metodu sekvenční injekční analýzy pro stanovení chondroitin sulfátu pomocí fenothiazinových kationtových barviv (azur B, azur A a methylenová modř) při použití spektrofotometrické detekce. Princip stanovení spočívá v reakci chondroitin sulfátu s kationtovým barvivem. Produktem je iontový asociát, při čemž jeho vznik způsobuje změnu absorpčního spektra barviva, míra poklesu absorbance při příslušné vlnové délce je úměrná koncentraci analytu.

Nejprve byla pozornost zaměřena na stanovení chondroitin sulfátu ve statickém uspořádání, byla nalezena absorpční maxima používaných barviv a jejich vhodná koncentrace ($4 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$). Dále byl pozorován vliv pH na toto stanovení. Zjistilo se, že není vhodné toto stanovení provádět v kyselém nebo naopak ve velmi zásaditém prostředí, tato prostředí významně zabraňují tvorbě asociátu. Poté byly proměřeny kalibrační závislosti používaných barviv. Nejnižší meze detekce a stanovitelnosti bylo dosaženo při použití barviva methylenové modře. V poslední řadě byly ve statickém uspořádání měřeny koncentrace chondroitin sulfátu v reálných vzorcích, kterými byly vybrané potravinové doplňky. Měření probíhalo dvěma způsoby a to metodou kalibrační přímky a metodou standardního přídávku. Obě metody se ukázaly jako vhodné pro stanovení chondroitin sulfátu, protože dávaly relativně přesné výsledky. Byl také sledován vliv interferentů a to heparinu jako zástupce podobného analytu a chloridu sodného jako silného elektrolytu, přičemž významný vliv byl pozorován právě u heparinu. Na závěr práce bylo provedeno stanovení chondroitin sulfátu v lidské moči a zjistilo se, že v této matici jsou interferenční látky, které ovlivňují stanovení chondroitin sulfátu.

Dále byla prováděna optimalizace metody sekvenční injekční analýzy pro stanovení chondroitin sulfátu. Optimalizovány byly parametry pro barvivo azur B a tyto optimální podmínky byly poté aplikovány i na ostatní barviva: koncentrace barviva ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), dávkovaný objem (100 μl CS + 50 μl barviva + 100 μl CS), reakční čas (0 s) a průtoková rychlost (40 $\mu\text{l s}^{-1}$). Za optimálních podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti. V tomto uspořádání bylo dosaženo nejnižší meze detekce a stanovitelnosti u barviva azuru A. Stejně jako v případě statického uspořádání byly i v tomto případě měřeny koncentrace chondroitin sulfátu v reálných vzorcích. Opět

byla použita metoda kalibrační přímky a metoda standardního přídatku. Jako přesnější se ukázala metoda kalibrační přímky, kde se vypočítané hodnoty lišily relativně málo od skutečných hodnot. Na závěr byla měřena koncentrace chondroitin sulfátu v přítomnosti interferujících látek a to heparinu a chloridu sodného, z nichž se jako významnější interferent projevil heparin. Analyt byl změřen v matrici lidské moči, která zřejmě obsahuje interferenty ovlivňující stanovení chondroitin sulfátu.

12. Alonso, A., Almendral, M.J., Curto, Y., Criado, J.J., Rodríguez, E., Manzano, J.L.: New fluorescent antitumour cisplatin analogue complexes. Study of the characteristics of their binding to DNA by flow injection analysis. *Journal of fluorescence* **17** (2007) 390-400.
13. Růžicka J.: Flow Injection Analysis, 4th Edition. Disk DVD, 2009.
14. Lioent, E.J., Alcántara-Durán, J., Ruiz-Medina, A., Ortega-Barrales, P.: Determination of carbendazim in food products using a sequential injection analysis optosensor. *Food anal. methods* **6** (2013) 1278-1283.
15. Ergorov, O., Matthew, J.O., Ruzicka, J., Grate, J.W.: Sequential injection separation system with stopped-flow radiometric detection for automated analysis of ^{99}Tc in nuclear waste. *Analytical chemistry* **70** (1998) 977-984.
16. Grate, J.W., Strebin, R., Janata, J.: Automated analysis of radionuclides in nuclear waste: Rapid determination of ^{90}Sr by sequential injection analysis. *Analytical chemistry* **68** (1996) 333-340.
17. Solich, P., Polášek, M., Klimundová, J., Ruzicka, J.: Sequential injection technique applied to pharmaceutical analysis. *Trends in analytical chemistry* **22** (2003) 116-126.
18. Wang J., Hansen E. H.: Sequential injection lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis. *Trends in Analytical Chemistry* **22** (2003) 225 – 231.
19. Miró M., Hansen E. H.: Miniaturization of environmental chemical assays in flowing systems: The lab-on-a-valve approach vis- a-vis lab-on-a-chip microfluidic devices. *Analytica Chimica Acta* **600** (2007) 46 – 57.
20. Ruzicka, J., Hansen, E.H.: Retro-review of flow-injection analysis. *Trends in analytical chemistry* **27** (2008) 390-393.
21. Castro M.D.L., Ruiz-Jiménez J., Pérez-Serradill J.A.: Lab-on-valve: a useful tool in biochemical analysis. *Trends in Analytical Chemistry* **27** (2008) 118 – 126.
22. Mesquita R.B.R., Rangel A.O.S.S.: A review on sequential injection methods for water analysis. *Analytica Chimica Acta* **648** (2009) 7 – 22.
23. Chen, X., Wang, J.: The miniaturization of bioanalytical assay and sample pretreatments by exploiting meso-fluidic lab-on-valve configuration: A review. *Analytical chimica acta* **602** (2007) 173-180.

24. Bár, L.: *Stanovení heparinu technikou SIA se spektrofluorimetrickou detekcí*. Diplomová práce, PřF UK, Praha 2011.
25. Voet, D., Voetová, J. G.: *Biochemie*. Victoria Publishing 1995.
26. Volpi, N.: Analytical aspects of pharmaceutical grade chondroitin sulfates. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **96** (2007) 3168-3180.
27. Sugahara, K., Mikami, T., Uyama, T., Mizuguchi, S., Nomura, K., Kitagawa, H.: Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Current Opinion in Structural Biology* **13** (2003) 612-620.
28. Henrotin, Y., Mathy, M., Sanchez, Ch., Lambert, C.: Chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: from in vitro studies to clinical recommendations. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* **2** (2010) 335-348.
29. Kahan, A., Uebelhart, D., De Vathaire, F., Delmas, P. D., Reginster, J.-Y.: Long-term effects of chondroitins 4 and 6 sulfate on knee osteoarthritis: the study on osteoarthritis progression prevention, a two-year, randomized, double-blind, placebocontrolled trial. *Arthritis & Rheumatism* **60** (2009) 524-533.
30. Liu, X., Li, L., Zhao, T., Dong, H.: Determination of chondroitin sulfate in tablets by Raman spectroscopy and near-infrared spectroscopy combined with chemometric methods. *Analytical Methods* **6** (2014) 4219-4227.
31. Vaculíková, E., Kvasnička, F.: Isotachophoretic determination of glukosamine and chondroitin sulphate in dietary supplements. *Czech journal of food sciences*. **31** (2013) 55-65.
32. Volpi, N.: High-performance liquid chromatography and on-line mass spectrometry detection for the analysis of chondroitin sulfates/hyaluronan disaccharides derivatized with 2-aminoacridone. *Analytical Biochemistry* **397** (2010) 13-23.
33. Nagarajan, P., Dinakaran, S. K., Ghosh, S., Avasarala, H., Nallayya, M., Banji, D.: Method development and validation for glucosamine and chondroitin sulphate in softlet form by RP-HPLC. *Research & Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis* **2** (2013) 6-10.
34. Ji, D., Roman, M., Zhou, J., Hildreth, J.: Determination of chondroitin sulfate content in raw materials and dietary supplements by high-performance liquid

- chromatography with ultraviolet detection after enzymatic hydrolysis: Single-laboratory validation. *Journal of AOAC International*. **90** (2007) 659-669.
35. Gatti et al., A simple and validated LC method for the simultaneous analysis of glukosamine and chondroitin sulfate equivalent in dietary products. *Journal of liquid chromatography and related technologies* **33** (2010) 1760-1775.
 36. Grimshaw, J.: Analysis of glycosaminoglycans and their oligosaccharide fragments by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **18** (1997) 2408 -2414.
 37. Bendazzoli, C., Liverani, L., Spelta, F., Prandi, M., Fiori, J., Gotti, R.: Determination of dermatan sulfate and chondroitin sulfate as related substances in heparin by capillary electrophoresis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **53** (2010) 1193-1200.
 38. Nimptsch, A., Schibur, S., Schnabelrauch, M., Fuchs, B., Huster, D., Schiller, J.: Characterization of the quantitative relationship between signal-to-noise (S/N) ratio and sample amount in-target by MALDI-TOF MS: Determination of chondroitin sulfate subsequent to enzymatic digestion. *Analytica chimica acta* **635** (2009) 175-182.
 39. Somashekar, P.L., Tripathy, A.S., Chandrashekar, J., Sathish, K.P., Palakshi, G.O.: Spectrophotometric determination of chondroitin sulfate in bulk drug and pharmaceutical formulation. *Der pharmacia lettre* **2** (2010) 283-288.
 40. Xueliang, N., Pingping, Z., Weili, Z., Wei, S.: A new electrochemical method for the determination of chondroitin sulfate based on its supramolecular interaction with the cupferron-lead(II) complex. *Journal of the serbian chemical society* **79** (2014) 199-209.
 41. Wan, S., Pingping, S., Yingzhong, Z., Hui, W., Shengli, L., Jieying, W., Yupeng, T.: Syntheses, crystal structures, nonlinear optical properties and cis-trans isomerization of functionalized sulfur-terminal [Zn(II) and Cd(II)] complexes based on phenothiazine-2,2':6',2''-terpyridine conjugated ligands. *Dyes and pigments* **115** (2015) 110-119.
 42. de Faria, P.A., Bettanin, F., Cunha, R.L.O.R., Paredes-Gamero, E.J., Homem-de-Mello, P., Nantes, I.L., Rodrigues, T.: Cytotoxicity of phenothiazine derivatives associated with mitochondrial dysfunction: A structure-activity investigation. *Toxicology* **330** (2015) 44-54.

43. <http://www.chemicaland21.com/specialtychem/finechem/AZURE%20B.htm>
(citováno dne 14. 4. 2015)
44. Sha, Y., Gao, Q., Qi, B., Yang, X.: Electropolymerization of azure B on a screen_printed carbon electrode and its application to the determination of NAHD in flow injection analysis systém. *Microchimica Acta* **148** (2004) 335-341.
45. <http://www.chemicaland21.com/specialtychem/finechem/AZURE%20B.htm>
(citováno dne 14. 4. 2015)
46. Friedrich, K., Seiffert, W., Zimmermann, H. W.: Romanowsky dyes and Romanowsky-Giemsa effect. 5. Structural investigations of the purple DNA-AB-EY dye complexes of Romanowsky-Giemsa staining. *Histochemistry* **93** (1990) 247-56.
47. Reddy, K.M., Chiranjeevi, P.: Extractive spectrophotometric determination of dimethoate in enviromental samples with azure B. *E-Journal of chemistry* **2:3** (2005) 193-198.
48. Kong, L., Liu, Z. F., Liu, S. P.: Resonance Rayleigh scattering method for direct determination of polyacrylamide in water samples using basic phenothiazine dyes. *Journal of Analytical Chemistry* **69** (2014) 149-156.
49. Nemcova, I., Rychlovsky, P., Havelcova, M.: Flow-injection analysis based on extraction and spectrophotometric determination of penicillins with thiazine dyes. *Analytical Letters* **42** (2009) 989-999.
50. Narayana, B., Cherian, T.: Spectrophotometric method for the determination of iodate in table salt using new chromogenic reagents. *South African journal of chemistry* **60** (2007).
51. Narayana, B., Cherian, T.: A facile spectrophotometric method for the determination of periodate using azure B. *Journal of the Brazilian chemical society* **16** (2005) 978-981.
52. Cherian, T., Narayana, B.: A New spectrophotometric method for the determination of arsenic in environmental and biological samples. *Analytical Letters* **38** (2005) 2207-2216.

53. Mathew, M., Narayana, B.: An easy spectrophotometric determination of selenium using azure B as a chromogenic reagent. *Indian Journal of Chemical Technology* **13** (2006) 455-458.
54. Mathew, M., Narayana, B.: A highly sensitive spectrophotometric method for the determination of trace copper using azure B as a chromogenic reagent. *Journal of Scientific & Industrial Research* **66** (2007) 28-31.
55. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/papers/7521974>, (citováno dne 14.4.2015)
56. <http://www.lobachemie.com/Biological-Stains-for-Microscopy-01606/AZUR-A-CASNO-531-53-3.aspx> (citováno dne 14. 4. 2015)
57. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/methylene_blue#section=Top (citováno dne 14. 4. 2015)
58. Schirmer, R.H., Adler, H., Pickhardt, M., Mandelkow, E.: ‘‘Lest we forget you – methylene blue...’’. *Neurobiology of aging* (2011).
59. Jiao, Q., Lui, Q.: Characterization of the interaction between blue and glykosaminoglykans. *Spectrochimica acta* **55** (1999) 1667-1673.
60. Opekar, F., Jelínek, I., Rychlovský, P., Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*, Praha, Karolinum 2002.